

**PFLANZENZELLKULTUREN
ALS QUELLE
OPIAT- UND BENZODIAZEPIN-
REZEPTOR AKTIVER METABOLITE**

Rosemarie Ruhoff

Disbui. München

1988

**PFLANZENZELLKULTUREN ALS QUELLE
OPIAT- UND BENZODIAZEPIN- REZEPTOR AKTIVER METABOLITE**

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Rosemarie Ruhoff
aus Köln

Juni 1989

1. REFERENT: PROF. DR. M.H. ZENK

2. REFERENT: PROF. DR. H. WAGNER

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 25.Juli 1988

1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anlagen	8
9. Glossar	9
10. Index	10
11. Bibliographie	11
12. Anhang	12
13. Literaturverzeichnis	13
14. Anlagen	14
15. Glossar	15
16. Index	16
17. Bibliographie	17
18. Anhang	18
19. Literaturverzeichnis	19
20. Anlagen	20
21. Glossar	21
22. Index	22
23. Bibliographie	23
24. Anhang	24
25. Literaturverzeichnis	25
26. Anlagen	26
27. Glossar	27
28. Index	28
29. Bibliographie	29
30. Anhang	30
31. Literaturverzeichnis	31
32. Anlagen	32
33. Glossar	33
34. Index	34
35. Bibliographie	35
36. Anhang	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Anlagen	38
39. Glossar	39
40. Index	40
41. Bibliographie	41
42. Anhang	42
43. Literaturverzeichnis	43
44. Anlagen	44
45. Glossar	45
46. Index	46
47. Bibliographie	47
48. Anhang	48
49. Literaturverzeichnis	49
50. Anlagen	50
51. Glossar	51
52. Index	52
53. Bibliographie	53
54. Anhang	54
55. Literaturverzeichnis	55
56. Anlagen	56
57. Glossar	57
58. Index	58
59. Bibliographie	59
60. Anhang	60
61. Literaturverzeichnis	61
62. Anlagen	62
63. Glossar	63
64. Index	64
65. Bibliographie	65
66. Anhang	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Anlagen	68
69. Glossar	69
70. Index	70
71. Bibliographie	71
72. Anhang	72
73. Literaturverzeichnis	73
74. Anlagen	74
75. Glossar	75
76. Index	76
77. Bibliographie	77
78. Anhang	78
79. Literaturverzeichnis	79
80. Anlagen	80
81. Glossar	81
82. Index	82
83. Bibliographie	83
84. Anhang	84
85. Literaturverzeichnis	85
86. Anlagen	86
87. Glossar	87
88. Index	88
89. Bibliographie	89
90. Anhang	90
91. Literaturverzeichnis	91
92. Anlagen	92
93. Glossar	93
94. Index	94
95. Bibliographie	95
96. Anhang	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Anlagen	98
99. Glossar	99
100. Index	100

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anlagen	8
9. Glossar	9
10. Index	10
11. Bibliographie	11
12. Anhang	12
13. Literaturverzeichnis	13
14. Anlagen	14
15. Glossar	15
16. Index	16
17. Bibliographie	17
18. Anhang	18
19. Literaturverzeichnis	19
20. Anlagen	20
21. Glossar	21
22. Index	22
23. Bibliographie	23
24. Anhang	24
25. Literaturverzeichnis	25
26. Anlagen	26
27. Glossar	27
28. Index	28
29. Bibliographie	29
30. Anhang	30
31. Literaturverzeichnis	31
32. Anlagen	32
33. Glossar	33
34. Index	34
35. Bibliographie	35
36. Anhang	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Anlagen	38
39. Glossar	39
40. Index	40
41. Bibliographie	41
42. Anhang	42
43. Literaturverzeichnis	43
44. Anlagen	44
45. Glossar	45
46. Index	46
47. Bibliographie	47
48. Anhang	48
49. Literaturverzeichnis	49
50. Anlagen	50
51. Glossar	51
52. Index	52
53. Bibliographie	53
54. Anhang	54
55. Literaturverzeichnis	55
56. Anlagen	56
57. Glossar	57
58. Index	58
59. Bibliographie	59
60. Anhang	60
61. Literaturverzeichnis	61
62. Anlagen	62
63. Glossar	63
64. Index	64
65. Bibliographie	65
66. Anhang	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Anlagen	68
69. Glossar	69
70. Index	70
71. Bibliographie	71
72. Anhang	72
73. Literaturverzeichnis	73
74. Anlagen	74
75. Glossar	75
76. Index	76
77. Bibliographie	77
78. Anhang	78
79. Literaturverzeichnis	79
80. Anlagen	80
81. Glossar	81
82. Index	82
83. Bibliographie	83
84. Anhang	84
85. Literaturverzeichnis	85
86. Anlagen	86
87. Glossar	87
88. Index	88
89. Bibliographie	89
90. Anhang	90
91. Literaturverzeichnis	91
92. Anlagen	92
93. Glossar	93
94. Index	94
95. Bibliographie	95
96. Anhang	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Anlagen	98
99. Glossar	99
100. Index	100



Digitized by the Internet Archive
in 2026

<u>I. EINLEITUNG</u>	1
<u>II. MATERIAL UND METHODEN</u>	25
1. Biologisches Material	26
1.1. Pflanzliches Material	26
1.1.1. Differenzierte Pflanzen	26
1.1.2. Pflanzliche Zellkulturen	27
1.2. Pilzmaterial	28
1.3. Versuchstiere	28
2. Spezielle Chemikalien	28
3. Geräte	31
4. Rezeptorologische Methoden	33
4.1. Bindungsstudien an Membranrezeptoren	33
4.2. Bindungsstudien bei Östrogenrezeptoren	37
4.3. Berechnung rezeptorologischer Ergebnisse	39
5. Aufarbeitung von Zellkultur-Material	47
5.1. Extraktion aus Kallusgewebe	47
5.2. Extraktion aus suspendiertem Gewebe	47
5.3. Applikation biotischer und abiotischer Agentien zum Kulturmedium	48
6. Aufarbeitung differenzierter Pflanzen	49
7. Chromatographische Verfahren	49
7.1. Dünnschichtchromatographie	49
7.2. Säulenchromatographie	51
7.3. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	51

II

8.	Spektroskopische Methoden _ _ _ _ _	52
8.1.	Massenspektroskopische Untersuchungen_ _ _	52
8.2.	Kernresonanzspektroskopie_ _ _ _ _	52

III. ERGEBNISSE _ _ _ _ _ 54

1.	Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsstudien bei methanolischen Extrakten aus Kalluskulturen_	55
1.1.	Vergleichende Studie der Opiat-und Benzo- diazepinrezeptor-Aktivität bei Extrakten aus Kallusgewebe_ _ _ _ _	55
1.2.	Auswahl pflanzlicher Zellkulturen mit ho- her Rezeptoraktivität zur Isolation, Reinigung und Charakterisierung des aktiven Prinzips_ _ _ _ _	75
2.	Nachweis eines Opiatrezeptor aktiven Metaboliten bei <u>Bocconia cordata</u> Pflanzen-Zellkulturen _ _ _	81
2.1.	Nachweis einer Dosis-Wirkungs-Beziehung der im Extrakt gemessenen Opiatrezeptor- Aktivität _ _ _ _ _	81
2.2.	Überprüfung eines methanolischen Extrakts aus der Suspensionskultur von <u>B. cordata</u> auf eine Opiatrezeptor-Aktivität_ _ _ _ _	82
2.3.	Zuordnung der Rezeptoraktivität zu einer chromatographisch detektierbaren Kompo- nenten im methanolischen Extrakt aus <u>B. cordata</u> Suspensionskulturen _ _ _ _ _	83

III

2.4. Isolation und Reinigung der aktiven Komponente aus methanolischen Extrakten aus <u>B. cordata</u> Suspensionskulturen_ _ _ _ _	86
2.5. Identifizierung des Opiatrezeptor aktiven Metaboliten bei <u>B. cordata</u> Suspensionskulturen _ _ _ _ _	90
2.6. Nachweis einer Opiatrezeptor-Aktivität von Sanguinarin aus <u>B. cordata</u> Zellkulturen_ _ _ _ _	94
3. Aufklärung des Benzodiazepinrezeptor aktiven Prinzips bei <u>Phaseolus radiatus</u> Pflanzen-Zellkulturen_ _ _ _ _	96
3.1. Überprüfung eines methanolischen Extrakts aus suspendierten Zellen von <u>Ph. radiatus</u> auf eine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität_ _	96
3.2. Nachweis einer Dosis-Wirkungs-Beziehung im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay bei Extrakten aus <u>Ph. radiatus</u> Zellkulturen_ _ _ _ _	97
3.3. Zuordnung einer im Rezeptorassay gemessenen Aktivität zu chromatographisch detektierbaren Komponenten_ _ _ _ _	98
3.4. Nachweis glykosidischer Bindung chromatographisch zugeordneter Wirkkomponenten _ _	108
3.5. Isolation und Reinigung der Wirkkomponenten WK1_ _ _ _ _	112

3.6. Strukturaufklärung der Wirkkomponenten	
WK1_ _ _ _ _	_115
3.7. Versuche zur Steigerung des Wirkstoff-	
gehalts bei <u>Ph. radiatus</u>	
Suspensionskulturen_ _ _ _ _	_124
3.8. Isolation und Reinigung der Wirk-	
komponenten WK2_ _ _ _ _	_131
3.9. Strukturaufklärung der Wirkkomponenten	
WK2 und WK3_ _ _ _ _	_134
3.10. Benzodiazepinrezeptor-Aktivität aus	
<u>Ph. radiatus</u> isolierter Coumestane _ _ _ _	_139
4. Untersuchungen zu	
Struktur-Wirkungs-Beziehungen an	
Östrogen- und Benzodiazepinrezeptoren	
von Coumestanen, Pterocarpanen und Isoflavonen_	_143
4.1. Struktur und Affinität von Coumestanen _ _	_144
4.2. Struktur und Affinität von Pterocarpanen _	_150
4.3. Struktur und Affinität Östrogener	
Isoflavone _ _ _ _ _	_152
<u>IV. DISKUSSION</u> _ _ _ _ _	_164
<u>V. ZUSAMMENFASSUNG</u> _ _ _ _ _	_208
<u>VI. LITERATURVERZEICHNIS</u> _ _ _ _ _	_212

VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

Aceton-D ₆	deuteriertes Aceton
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
Ci	Curie
	(1 Ci= $2,2 \times 10^{12}$ Zerfälle pro Minute)
CI	Chemische Ionisation
cpm	Zählrate (counts per minute)
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-D ₆	deuteriertes DMSO
EI	Elektronenstoß Ionisation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FG	Frischgewicht
FLU	Flunitrazepam
h	Stunde(n)
HETCOR	heteronuclear correlated spectroscopy
HPLC	high pressure liquid chromatography
I	Inhibitor (unmarkierter Ligand)
IC	Inhibitorkonzentration
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei welcher die spezifische Radioligandbindung am Rezeptor zu 50% gehemmt wird
INEPTRD	intensive nuclear enhanced polarisation transfer (recovery delay)
J	Koppelungskonstante
L	Radioligand
LM	Laufmittel
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrum
NMR	Kernresonanzspektroskopie
ppm	parts per million
R	Rezeptor
RI	Rezeptor-Inhibitor-Komplex
RIA	Radioimmunoassay
RL	Rezeptor-Radioligand-Komplex
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
WK	Wirkkomponente



I. EINLEITUNG

" Das menschliche Denken eröffnet also eine neue Ära in der Geschichte der Natur...Vom Menschen an und im Menschen ist die Evolution ihrer selbst reflektiert bewußt geworden. Sie kann von nun an in gewissem Maße ihren Ort in der Welt erkennen, ihre Richtung wählen, die Anstrengung verweigern...Diese neuen Bedingungen werfen auf Erden die unermeßliche Frage der Pflicht und ihrer Modalitäten auf. Wozu wirken - und wie wirken? "
(CHARDIN de,1931)

Die Naturgeschichte des Menschen, Anthropologie, ist gekennzeichnet durch die Nutzbarmachung der Natur für den Menschen im Gebrauch von Feuer, Wasserkraft, Mineralien sowie von Tier und Pflanze. Auch wenn die Zeit der Jäger, Fischer und Sammler im ständigen Kampf mit ihrer unwirtschaftlichen Umgebung längst vorbei zu sein scheint, ist die Natur, so auch die Pflanze bis heute eine Quelle seiner materiellen Lebensgrundlage geblieben. Als Konstruktionsmaterial, Rohstoff für Gewebe und Papier, als Brenn- oder Kraftstoff, als Nahrung und Arznei besitzt die Pflanze bis in unsere Zeit große wirtschaftliche Bedeutung (FOWLER und SCRAGG, 1988).

Seit der Antike sind Pflanzen als Heilkräuter beschrieben z.B. bei Theophrastos Eresios (371-286 v.Chr.) und Hippokrates (460-370 v.Chr.). Aus der Pflanzenfamilie der Solanaceen werden Atropa-, Datura- und Hyoscyamus-Spezies als Gift- und Zauberpflanzen deklariert. Auch der Schlafmohn, Papaver somniferum, findet schon Erwähnung bei Theophrastos, im alten Kreta gebrauchte man den Mohn als Schlaf- oder Schmerzmittel, und auch die Assyrer kannten ihn (EIDEN, 1987). Das älteste "Kräuterbuch" von Otto BRUNFELS (1498-1534), ein Kräuterbuch von Hyronymus BOCK (1498-1554) sowie von Leonard FUCHS geben alte Zeugnisse der vielfältigen Verwendung der Pflanze als Arznei. "FUCHSIUS" (1542) ist der erste Autor, der die Eigenschaften von Digitalis beobachtet: "From him it receives its name of Digitalis, in allusion of

the German name of Fingerhut, which signifies a finger-stall, from the blossoms resembling the finger of a glove"(WITHERING, 1984). Mit Foxglove - die angelsächsische Bezeichnung des Fingerhuts - blicken wir zurück auf 200 Jahre Behandlung mit Digitalis. Die Verwendung der Chinarinde, Cinchona succirubrae, bei Malaria tropica findet man seit mehr als 300 Jahren. Wäßrige Extrakte der Chinarinde, vorwiegend geerntet von wild wachsenden Bäumen, häufig von Cinchona calisaya WEDELL., wurden in tropischen Wäldern der Anden bereits im 17. Jahrhundert eingesetzt als empirisches Mittel gegen Malaria (MERKUS & SMIT, 1988).

Während die alten Kräuterbücher eine Fülle an Information darüber geben, wie die Kräuter gebraucht werden sollen, zu welchen Zeiten sie gesammelt und wo und wie man sie aufbewahren soll, wußte man wenig über das wirksame Prinzip der wäßrigen und alkoholischen Auszüge, der Kataplasmen und Tinkturen. Von welchen Substanzen der Pflanze die heilende, nützliche oder auch giftige Wirkung ausgeht, wußten unsere Vorfahren nicht. Sie wußten,
" wozu " sie " wirken " .

JAHRE	ENTDECKER	PFLANZENBASE
1806	SERTÜNER	Morphin
1817	ROBIQUET	Noscapin
1817	ROBIQUET	Narcotin
1817	PELLETIER/MAGENDIE	Emetin
1818	PELLETIER/CAVENTOU	Strychnin
1819	OERSTED	Piperin
1820	RUNGE	Coffein
1820	PELLETIER/CAVENTOU	Chinin
1820	PELLETIER/CAVENTOU	Chinchonin
1832	ROBIQUET	Codein
1835	PELLETIER	Thebain
1848	MERCK	Papaverin

TABELLE 1: Historischer Überblick zur Entdeckung von Alkaloiden

Bahnbrechend auf der Suche nach dem "Magisterium opii" gelang es 1806 Friedrich Wilhelm Sertürner aus Opium, dem Saft -opos- des Schlafmohns Papaver somniferum die Morphin-Base Morphin, benannt nach dem griechischen Gott des Schlafs, *Morpheus*, zu isolieren. Dieses "principium somniferum" war grundlegend für das Bekanntwerden ähnlicher Stoffe (MOTHES, 1981) sowie die Erforschung weiterer Opiumbestandteile (Tabelle 1).

Bis in unsere Tage leisten Pflanzen abgeleitete Chemikalien, die z.T. unter dem Begriff Sekundärmetabolite gestellt werden (Verbindungen, die nicht essentiell für das Überleben der Pflanzenzelle und so nicht jeder Pflanzenzelle eigen sind), ihren Beitrag zur Gewinnung von Geruchs- und Geschmacksstoffen, Pigmenten und Farbstoffen, Agrochemikalien, Insektiziden und Medikamenten. Die bedeutendsten Sekundärmetabolite sind jene, die pharmazeutische Verwendung finden (FARNSWORTH und MORRIS, 1976; BALANDRIN et al., 1985; FOWLER und SCRAGG, 1988). Viele solcher pharmakologisch aktiver Verbindungen sind in ihrer Struktur äußerst komplex und ihre chemische Synthese zu kostenaufwendig. Auch heute noch werden Morphin und Codein aus Latex unreifer Samenkapseln von Papaver somniferum gewonnen, Chinin und Chinidin aus der Rinde von Cinchona-Bäumen isoliert. Als Quelle der Cardinolidgewinnung dienen Digitalis-, Convallaria- oder Strophantus-Spezies. Eine Extraktion der Tropanalkaloide aus Solanaceen wie Atropa, Hyoscyamus, Datura oder Dubiosa findet kommerzielle Anwendung (BERLIN, 1988). VICKERRY und VICKERRY (1981) listen eine Fülle von Pflanzen abgeleiteten Arzneistoffen auf, welche in der orthodoxen Medizin benutzt werden, z.B. Anthrachinone aus Aloe- und Cassia-Spezies, Terpene aus Valeriana wallichii mit sedierenden Eigenschaften, die Steroid abgeleiteten Herzglykoside aus Digitalis purpurea und lanata. Überwiegend in seiner Auflistung ist jedoch die große Gruppe der Alkaloide. Eine Auswahl der medizinisch bedeutsamen fassen FOWLER und SCRAGG (1988) tabellarisch zusammen (Tabelle 2).

<u>PYRROLIDINE</u>	<u>WIRKUNG</u>	<u>SPEZIES</u>
Atropin	spasmolytisch	<u>Datura stramonium</u>
Lyocyamin		
Scopolamin	anticholeretisch	<u>Datura metel</u>
Cocaine	anaestetisch	<u>Erythroxylum coca</u>
<u>PYRIDINE/ PIPERIDINE</u>		
Nicotin	vegetative	<u>Nicotiana tabacum</u>
Coniine	Gift	<u>Conium maculatum</u>
Ricinin	Gift	<u>Ricinus communis</u>
<u>INDOLE</u>		
Vincristin	antileukämisch	<u>C.roseus</u>
Vinblastin	antileukämisch	<u>C.roseus</u>
Serpentin	herzwirksam	<u>C.roseus</u>
Ajmalicin	herzwirksam	<u>C.roseus</u>
Reserpin	antihypertensiv	<u>Rauwolfia serpentina</u>
<u>CHINOLINE</u>		
Chinin	antimalaria	<u>Cinchona</u>
Chinidin	herzwirksam	<u>Cinchona</u>
<u>ISOCHINOLINE</u>		
Mescaline	halluzinogen	<u>Lophophora</u> <u>williamsii</u>
Papaverin	relaxierend	<u>Papaver</u>
Tubocurarin	relaxierend (Skelettmuskel)	<u>Strychnos</u>
Berberin	antiphlogistisch antibakteriell	<u>Berberis</u>
Emetin	antiamoebisch	<u>Cephaelis</u> <u>ipecacuntia</u>
Morphin	analgetisch narkotisch	<u>Papaver somniferum</u>
Codein	antitussiv	<u>Papaver somniferum</u>
Thebain	zentral erregend	<u>Papaver somniferum</u>
Colchicin	Mitose-Inhibitor	<u>Colchicum</u>

TABELLE 2: Medizinisch verwendete Alkaloide (FOWLER und SCRAGG, 1988)

Bisher konnten die Pflanzen als Quelle solch pharmakologisch aktiver Metabolite nicht ersetzt werden durch Arzneistoffe mikrobieller oder chemischer Herkunft (BERLIN, 1988). Die Mehrheit der Pflanzen, die pharmazeutisch bedeutsame Sekundärmetabolite enthalten, werden auf Plantagen im großen Maßstab angebaut (CHATTERJEE, 1978) oder entstammen aus Wildsammlungen (FARNSWORTH, 1984). Die daraus resultierenden Probleme sind vielfältig je nach Klimazone, Herkunftsland oder Art der Droge im Detail sehr heterogener Natur. Sie lassen sich jedoch stichwortartig zusammenfassen in möglichem Ernteausfall, klimatisch saisonale Schwankungen, geographische, infrastrukturelle sowie politische Probleme der exportierenden Länder, Schwankungen in der Drogenqualität, geringe Flexibilität gegenüber der Nachfrage auf dem Markt (BERLIN, 1983; ANDERSON et al., 1986).

Eine alternative Technik zur konventionellen Agrarkultur von Pflanzen als Quelle von Gewürzen, Duftstoffen, Farben, Insektiziden und Pharmazeutika wurde in den fünfziger Jahren vorgeschlagen (SCRAGG, 1986). Das Konzept pflanzliche Zellkulturen zu benutzen, um verschiedene Produkte herzustellen stammt von ROUTIER und NICKELL (1956) sowie TULECKE und NICKELL (1959). Die erfolgreiche Regeneration von Daucus carota Pflanzen aus frei suspendierten Pflanzenzellen gelang 1958 (REINERT; STEWARD et al.). Die Totipotenz der Einzelzelle zeigt, daß alle Fähigkeiten der differenzierten Pflanze bei Kultivierung dedifferenzierten Pflanzengewebes als genetische Information erhalten bleiben, ad rem die Information für spezifische Syntheseleistungen. Die Totipotenz der Zelle bietet die Möglichkeit der biotechnologischen Nutzung der Pflanzenzelle für die Produktion interessanter Metabolite, die Möglichkeit, für die " Evolution " eine " Richtung " zu "wählen ".

Es sollte somit kein prinzipielles Problem sein, die pflanzliche Sekundärstoff-Produktion in Form pflanzlicher Zellkul-

turen zu etablieren. Es ist von besonderem Interesse für die pharmazeutische Industrie, wenn eine fabrikmäßige Herstellung möglich wäre (SHULER, 1981). Die ökonomische Bedeutung biotechnologischer Anwendungen, d.h. das Einbeziehen biologischer Systeme und Prozesse in technische Verfahren, wird deutlich bei der Herstellung von Antibiotika.

Eine große Vielzahl von pflanzlichen Produkten wurde in Pflanzen-Zellkulturen gefunden (FOWLER, 1983; CURTIN, 1983; SAHAI und KNUTH, 1985). Anlaß zum Optimismus gibt auch die kürzliche Entwicklung eines in Japan etablierten kommerziellen Systems der Shikonin-Produktion (FUJITA, 1988). 1974 berichtete TABATA über die Fähigkeit von Lithospermum erythrorhizon Kalluskulturen, Shikonin-Derivate zu bilden. Durch Screening (Auslese) der Zellkulturen nach Farbstoffgehalt und Optimierung der Kulturbedingungen unter Verwendung eines Wachstums- und Produktionsmediums wurde die kommerzielle Herstellung von Shikonin-Derivaten in Japan möglich (FUJITA et al., 1981a; 1981b; FUJITA et al., 1985). Mitsui Co. Ltd. beginnt Shikonin als Farbstoff in einem Bio-Lippenstift zu vermarkten. Durch Selektion konnten bei Coptis japonica Zelllinien mit hohen Ausbeuten an Berberin gewonnen werden (FUJITA, 1988). Eine Produktionssteigerung des Berberin auf einen Gehalt von 0,6 g/l/d war darüberhinaus durch Zusatz von Gibberelinsäure zum Kulturmedium möglich (MORIMOTO et al., 1986, FUJITA, 1988). Mehr als 2g/l Medium Ajmalin können bei Rauwolfia serpentina Suspensionskulturen gebildet werden (VOLLOSOVITCH, 1988). Jedoch sind hohe Konzentrationen des Alkaloids für Rauwolfia Zellen extrem toxisch. Ein Ajmalingehalt von 50 mg pro l Kulturmedium tötet die Zellen ab. ULBRICH et al. (1985) berichten über die Produktionssteigerung von Rosmarinsäure bei Coleus blumei auf 23% des Trockengewichts durch Verwendung eines Produktionsmediums. Bei der Rubiaceae Morinda citrifolia konnten 2,5 g Anthrachinon-Derivate pro Liter durch Medien-

variation erzeugt werden (ZENK et al., 1975). Immunologisch aktive Polysaccharide können aus Echinacea purpurea Gewebekulturen in industriellem Maßstab hergestellt werden (WAGNER et al., 1989).

Im Gegensatz zu den eben genannten Beispielen werden viele kommerziell interessante Verbindungen nur in Spuren oder nicht gebildet. Viele Produkte, die in großen Mengen vorkommen, sind nicht die wirtschaftlich attraktiven (FOWLER und SCRAGG, 1988). In Kallusgewebe, das aus verschiedenen Organen von Papaver somniferum und Papaver bracteatum angelegt wurde, konnten keine Morphinane nachgewiesen werden (FURUYA et al., 1972; IKUTA et al., 1974). Suspensionskulturen von Papaver somniferum produzierten nur Spuren von Thebain, Codein und Morphin (KHANNA et al., 1978). Während ein hoher Gehalt an Codein in einer Suspensionskultur von P. somniferum identifiziert wurde, konnte hier kein Thebain und Morphin nachgewiesen werden (TAM et al., 1980; CONSTABEL et al., 1980). Die dimeren Indol-Alkaloide aus Catharanthus roseus Vinblastin und Vincristin wurden trotz beträchtlicher Mühen in Kulturen nicht entdeckt. Die beiden mitosehemmenden Chemotherapeutica sind wertvoll bei der Behandlung der Leukämie und kommen in nur sehr geringen Mengen in der Pflanze Catharathus roseus vor. Jedoch die Akkumulation von Ajmalicin, welches bei Kreislaufdysregulation angezeigt ist, sowie Serpentin, aus welchem durch Reduktion mit Borhydrid Ajmalicin gewonnen werden kann, konnte durch Variation der Produktionsmedien verbessert werden (ZENK et al., 1977). Durch Autofluoreszenz-Detektion und Verwendung eines spezifischen Radioimmunoassay konnten höher produzierende Zelllinien von C. roseus isoliert werden (DEUS-NEUMANN und ZENK, 1982). Häufig zeigen solche Zelllinien jedoch Instabilität in der Produktion des gewünschten Metaboliten. Dies konnte für Ajmalicin und Serpentin bei C. roseus Suspensionskulturen und an weiteren Beispielen gezeigt werden (DEUS-NEUMANN und ZENK, 1984).

Geeignete Techniken des Screenings, der Auslese Sekundärmetabolit akkumulierender Zelllinien, wurden in den letzten Jahren etabliert (PARR, 1988; BERLIN und SASSE, 1985). Ein Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sortieren (BROWN et al., 1984) wird als grundlegende Methode eines möglichen automatisierten Systems für einzelne Zellen diskutiert. Neben einer Detektion von varianten Zelllinien im UV-Licht oder Fluoreszenz-Mikroskop ist eine Identifizierung interessanter Kalli bei starkgefärbten Metaboliten wie dem Shikonin mit dem bloßen Auge möglich (TABATA et al., 1978). Besonders für farblose Produkte ist der Radioimmunoassay sowie ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) die Detektionsmethode erster Wahl (WEILER, 1977; ROBINS, 1986). Aufgrund hoher Empfindlichkeit immunologischer Detektionsverfahren ist die Untersuchung von Kalluskulturen schon im frühen Stadium möglich. In der Tat werden große Differenzen der Akkumulationskapazität für Alkaloide zwischen einzelnen Zellen oder Klonen der Population von Zellkulturen wie Catharantus roseus und Hyoscyamus mit radioimmunologischen Methoden analysiert (ZENK et al., 1977; OKSMAN-CALDENTEY und STRAUSS, 1986).

Bei Induktion des Zellwachstums in Kultur werden Pflanzenzellen dedifferenziert. Dabei können Schwankungen sowohl morphologischer Art als auch im Metabolismus einzelner Zellen manifestiert werden. Ein zentrales Problem entdifferenzierter pflanzlicher Zellkulturen besteht in einer Entkopplung der Sekundärmetabolit-Biosynthese und der cytoologisch morphologischen Zelldifferenzierung.

Eine Untersuchung redifferenzierten Gewebes der Zwiebel Allium cepa zeigte eine Reihe von Vesikeln im Cytoplasma, welche in undifferenziertem Kallusgewebe fehlten (TURNBALL et al., 1981). Die Autoren führen den Mangel an Biosynthesestufen der Gewürzträger beim Gewebekallus zurück auf die Abwesenheit solcher Strukturen. Bei Differenzierung der Kalluskulturen in Wurzeln oder Ausläufer wird die Fähigkeit

der Gewürzstoff-Bildung wiedererlangt (TURNBALL et al., 1981).

Zur Induktion der Biosynthese von Monoterpenen in Gewebekulturen, welche morphologisch undifferenziert und biosynthetisch inaktiv waren, wurde bei Centranthus macrosiphon, Centranthus ruber and Valeriana officinalis eine Organogenese ausgelöst (VIOLON et al., 1984). Die Valepotriat-Bildung konnte durch Wurzelmorphogenese gesteigert werden bis zu Gehalten, welche die Elternpflanzen aufweisen. Die gesteigerte Produktion konnte hier in Beziehung gesetzt werden zur Bildung intrazellulärer Öl enthaltender Vesikel, welche eng vergesellschaftet mit dem Tonoplasten in Erscheinung traten (VIOLON et al., 1983). Dies ist bedeutsam, da im Fall der Monoterpen Bildung bei der intakten Pflanze solche und andere lipophile Verbindungen häufig in spezialisierte Zellen oder Gewebe sezerniert werden (BROWN und CHARLWOOD, 1986).

RUSH et al. (1985) zeigten eine Wechselbeziehung des Auftretens von Morphinan-Alkaloiden und einer Differenzierung Latex enthaltender Zellen bzw. Milchröhren während der Keimlingsbildung bei Papaver bracteatum. DBIR et al. (1984) beschreiben eine Entwicklung solcher Latiferen bei Calotropis procera Kalluskulturen. Ergebnisse bei P. bracteatum Zellkulturen dokumentieren, daß Thebain und Sanguinarin in verschiedenen Kompartimenten oder sogar in unterschiedlichen Zelltypen akkumulieren (KUTCHAN et al., 1985).

Digitalis purpurea erzeugt als entdifferenzierte Kalluskultur nur wenig Digitoxin, jedoch unter Bildung von Ausläufern kann die Cardinolid-Akkumulation wesentlich gesteigert werden (HAGIMORI, M. et al., 1980). Darüberhinaus berichten GRAVE et al. (1980), daß bei Digitalis lanata Zellkulturen die Fähigkeit zur Biosynthese von Herzglykosiden mit dem Einsetzen der Embryogenese einhergeht. Für viele weitere

Inhaltstoffe läßt sich diese Korrelation morphologischer und chemischer Differenzierung zeigen (HIROAKA und TABATA, 1974; TABATA et al., 1972; KOUL et al., 1983, WIERMANN, 1981; LUCKNER und DIETRICH, 1984).

Das Konzept der inversen Beziehung zwischen Protein-Biosynthese und Sekundärstoff-Bildung (PHILLIPS und HENSHAW, 1977; LINDSEY und YEOMAN, 1983) ist experimentell belegt (LINDSEY, 1985). ZENK et al. (1977) belegen die enge Beziehung der Produkt-Synthese zur veränderten Balance der Wachstumsbedingungen. Durch Auswahl eines Systems mit optimalen Wachstums- und Produkt-Akkumulationskinetiken kann eine hohe Produktivität erreicht werden.

Die Kinetik des Wachstums und der Alkaloid-Akkumulation kann bei Catharanthus roseus durch eine Medienvariation manipuliert werden (ZENK et al., 1977; KNOBLOCH und BERLIN, 1980). Eine Optimierung der Kulturbedingungen wird benötigt für eine Verbesserung der Sekundärmetabolit-Synthese (MANTELL und SMITH, 1983; MORRIS et al., 1985; FULLER und BARLETT, 1985; ROBBINS, 1986; PARR, 1988). Der Gehalt an Rosmarinsäure wurde durch ein einfaches Produktionsmedium bei Coleus blumei gesteigert (ULBRICH et al., 1985). Die Anthrachinon-Bildung bei Morinda citrifolia (ZENK et al., 1975), der Gehalt an Protoberberin-Alkaloiden bei Coptis und Berberis (BREULING et al., 1985; FUKUI et al., 1982), die Ausbeute von Diosgenin bei Dioscorea deltoidea (KAUL und STABA, 1968) und Nicotin bei Nicotiana tabacum (MANTELL et al., 1983) sind Beispiele erfolgreicher Produktionssteigerung durch veränderte Kulturbedingungen bei in vitro wachsenden Pflanzenzellen.

Die Bedeutung der hormonalen Organisation (ZENK et al., 1975, 1977; KURZ und CONSTABEL, 1979; RHODES et al., 1986) und des Nährstoffangebots (MÉRILLON et al., 1986; SCHULTE et

al.,1984; PAYNE et al.,1987, SCHIEL et al., 1984; KNOBLOCH und BERLIN,1980; SASSE et al.,1982)für eine optimale Synthese-Leistung wird durch zahlreiche Arbeiten dokumentiert (PARR, 1988).Der Einfluß des pH-Werts (MARTIN,1980; KOUL et al.,1983) und der Temperatur (HAZEL,1983; NETTLESHIP und SLAYTOR,1974), von CO₂ und Sauerstoff auf die Sekundärstoff-Synthese (SMART und FOWLER,1981; SCRAGG et al.,1987; BREU-LING et al.,1985)ist belegt.Über die Auswirkung des Lichtes verschiedener Qualität und Intensität berichten verschiedene Autoren (PARR,1988).

Grundlegende Gesetzmäßigkeiten der Lebensprozesse zu erkennen, Naturstoffe als einen Hebel zur Lenkung dieser Prozesse im Interesse des Menschen zu nutzen wird dem Menschen eröffnet durch die Mannigfaltigkeit der belebten Materie (ANISIMOV und CIRVA,1980). Auch ohne "die Anstrengung" des Menschen hat die "Evolution ihre Richtung" gewählt.

Die Fähigkeit der Lebewesen mit ihrer umgebenden Außenwelt in Beziehung zu treten, Wechselwirkungen mit der Umwelt auszuprägen, hat ihrem Lebensraum Gestalt gegeben. HAECKEL bezeichnet (1872) diese Beziehungen der Organismen zur umgebenden Außenwelt, zu "organischen und anorganischen Existenzbedingungen" als Ökologie (SCHILDKNECHT,1976). Kommunikationsmittel in diesem Geschehen sind chemisch definierte und definierbare Substanzen.

Eine Vielzahl von Verbindungen, welche strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen oder identischer Struktur sind, wurden bei Pflanze und Tier identifiziert (NAHRSTEDT,1982). Viele dieser Verbindungen sind niedermolekulare Sekundärstoffe, von denen man zunächst annahm (CZAPEK,1921), daß ihr Vorkommen sich auf das Pflanzenreich beschränke. BUTENAND,

EISNER, KARLSON, REICHSTEIN, ROTHSCILD und SCHILDKNECHT sind Autoren, die nicht nur die Existenz tierischer Sekundärstoffe aufzeigten, sondern ihnen auch eine entscheidende Funktion in der "ökologischen Biochemie" (SCHLEE,1986) zuordnen konnten (MOTHES,1980; HARBORNE,1982; SCHLEE,1986). Vielfach ungeklärt ist, ob solche Naturstoffe von den Tieren z.B. mit der Nahrung aufgenommen werden oder Ergebnis spezieller Stoffwechselwege bei diesen Lebewesen sind (NAHRSTEDT,1982).

Bei den Arthropoden findet man sehr häufig Stoffe struktureller Ähnlichkeit mit pflanzlichen Sekundärmetaboliten. Die Mannigfaltigkeit gefundener Strukturen ist erstaunlich. Bei Ameisen findet man Monoterpene als Alarm- und Wehrsubstanzen. "Der Krieg mit chemischen Waffen ist also nicht erst vom Menschen erfunden worden" (NAHRSTEDT,1982). Blattkäfer können Digitoxigenin-Glykoside selbst synthetisieren (PASTEELS und DALOZE,1977). Neben den Insekten und Crustaceen findet man bei vielen niederen Tieren, z.B. den Korallen und Stachelhäutern, aber auch bei Vertebraten, z.B. Amphibien eine Fülle verschiedenster Sekundärstoffe (NAHRSTEDT, 1982).

Doch selbst bei den Mammalia wird das Vorkommen pflanzentypischer Sekundärmetabolite diskutiert. GRUBER et al. (1980) postulieren, daß das natriuretische Hormon NH, welches eine regulatorische Funktion bei der renalen Natrium-Exkretion einnimmt, eine digitalis-ähnliche Verbindung ist. Aus dem Plasma des Hundes wurde eine Substanz isoliert, welche mit Digitoxin um zwei spezifische Digitoxin-Antikörper konkurriert sowie eine Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase aufweist (GRUBER,1980).

Im Zentralnervensystem, im Urin und der cerebrospinalen Flüssigkeit verschiedener Arten wurde gegen Ende der siebziger Jahre eine Morphin ähnliche Verbindung entdeckt, die

nicht als Peptid identifiziert werden konnte (GINTZLER et al., 1976; BLUME et al., 1977; SHORR et al., 1978; GINTZLER et al. (1978). Bei Rind und Kaninchen, bei der Ratte und Amphibien wurde Morphin identifiziert (OKA et al., 1985; HAZUM et al., 1981; GOLDSTEIN et al., 1985). Die Autoren (HAZUM et al., 1981) schließen die Möglichkeit nicht aus, daß die Verbindung ein Nahrungsbestandteil ist. Radioimmunoassays (GOLDSTEIN, 1975) wurden zur Detektion Morphin abgeleiteter Substanzen verwendet, gaschromatographische und massenspektroskopische Untersuchungen bestätigen das Vorkommen von Morphin und Codein im Gehirn von Säugern (WEITZ et al., 1986).

Es gibt Anhaltspunkte für eine mögliche Biosynthese von Morphin bei Säugetieren (DONNERER et al., 1986). Eine in vivo und in vitro Umwandlung von Retikulin in Salutaridin durch die Rattenleber konnte gezeigt werden (WEITZ et al., 1987). Diese Experimentalbefunde stützen die Hypothese, daß Morphin und Codein im Gehirn endogener Herkunft sind. WEITZ et al. (1987) nehmen an, daß ein oder mehrere Schritte der Morphinbiosynthese in verschiedenen Geweben stattfinden.

Umgekehrt beschreiben neuere Arbeiten auch das Vorkommen von Peptiden und niedermolekularen Verbindungen bei Pflanzen, welche ganz spezifische Funktionen beim tierischen Organismus einnehmen und bisher auf das Reich der Tiere beschränkt zu sein schienen.

Immunoreaktives und biologisch aktives Somatostatin ähnliches Material wurde in Extrakten von Nicotiana tabacum gefunden (WERNER et al., 1985). Das Neuropeptid Somatostatin gehört zu den hypothalamatischen Releasing-Hormonen und inhibiert die Sekretion des somatotropen Hormons, des Wachstumshormons. Die physiologische Bedeutung des Tabak-Somatosta-

tins ist bislang unbekannt (WERNER et al., 1985). Auch andere Autoren berichten vom pflanzlichen und mikrobiellen Somatostatin (LEROITH et al., 1982; LEROITH und ROTH, 1984; LEROITH et al., 1985; GREEN et al., 1985). Die Funktion solcher Peptide und Hormone als mögliche interzelluläre Kommunikationsmechanismen, welche in der Evolution ausgeprägt wurden, wird diskutiert (LEROITH und ROTH, 1984; LEROITH et al., 1985).

Andere für den tierischen Organismus charakteristische Hormone werden bei Mikroorganismen und Pflanzen beschrieben, z.B. Calcitonin, Cholecystokinin, das tyreotrope Hormon (LEROITH und ROTH, 1984), β -Endorphin sowie Insulin (LEROITH und ROTH, 1984; LEROITH et al., 1982; COLLIER et al., 1987). Eine kürzlich erschienene Arbeit dokumentiert das Vorkommen von Hämoglobin in den Zellen pflanzlicher Wurzeln (APPLEBY, 1988).

Auch Fettsäure-Derivate, die hormonelle oder regulatorische Aktivitäten entwickeln wurden bei der Pflanze entdeckt. GREGSON et al. (1979) berichten über die Prostaglandine PGE₂ und PGF_{2a} bei der Rotalge Gracilaria lemaneiformis. Ecdysone, Steroidhormone, die für die Metamorphose von Insekten und Crustaceen notwendig sind, findet man Mitte der sechziger Jahre auch bei Pflanzen (NAHRSTEDT, 1982). Über ihre Bedeutung bei der Pflanze weiß man nichts (REES, 1971; GEUNS, 1978). Oestron, Testosteron und Androstantriol kommen bei Pflanzen vor und ihre Wirkungen auf Pflanzenwachstum und -entwicklung wurden untersucht (GEUNS, 1978). Die biologisch aktive Form des Vitamin D, das 1,25 Dihydroxyvitamin D₃, welches in der Niere gebildet wird und die Calcium- sowie Phosphatabsorption aus dem Darm vermittelt, wurde in glykosidisch gebundener Form bei Solanum malacoxylon gefunden (WASSERMAN et al., 1976).

Eine andere Spezies aus der Familie der Solanaceae erregte mit einem pharmazeutisch äußerst interessanten Inhaltstoff

Aufsehen. Bei Solanum tuberosum konnten verschiedene pharmakologisch aktive Benzodiazepine isoliert werden (WILDMANN, 1988). Auch beim Weizen (WILDMANN, 1988; WILDMANN et al., 1987;) und anderen Getreidesorten sowie im Fischpulver wurden sie kürzlich entdeckt (MÜLLER, 1988). Während bei der Kartoffel Lormetazepam, ein 3-Hydroxybenzodiazepin, dominiert, fand sich beim Weizen das Diazepam. Jedoch nicht alle in Pflanzen gefundenen Benzodiazepine werden therapeutisch verwendet (WILDMANN, 1988).

Die Benzodiazepine gehören zu der bedeutsamsten Gruppe der Tranquillizer. Neben ihrer sedativ-hypnotischen und anxiolytischen Wirkung zeichnen sie sich durch antikonvulsive und muskelrelaxierende Eigenschaften aus. Pionier und Vater der 1,4-Benzodiazepine ist STERNBACH. Er synthetisierte erstmals 1955 ein Benzodiazepin (STERNBACH, 1983). Chlordiazepoxid (*Librium*®) erschien erstmals 1960 auf dem Markt (STERNBACH, 1983) und verdrängte die mit toxikologischen und teratologischen Risiken behafteten Barbiturate.

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, ob Benzodiazepin ähnliche Moleküle ausschließlich chemischer oder biologischer Herkunft sind. In menschlichem Autopsiematerial, welches seit 1940 gelagert wurde, konnten ebenfalls Benzodiazepin ähnliche Strukturen detektiert werden (SANGAMESWARAN et al., 1986). Im Gehirn von Rind und Mensch (SANGAMESWARAN et al., 1986; SANGAMESWARAN und BLAS de, 1985) konnte man sie immunologisch, chromatographisch und spektroskopisch nachweisen. Die Autoren lassen offen, ob sich die in geringen Mengen nachgewiesenen Diazepam-Derivate von industriell hergestellten Derivaten ableiten oder "100% Natur sind" (MÜLLER, 1988; SANGAMESWARAN et al., 1986; WILDMANN, 1988).

Eine mögliche Biosynthese der Benzodiazepine durch Mikroorganismen oder Pflanzen wird in Erwägung gezogen (SANGAMESWARAN et al., 1986, WILDMANN, 1988). Eine Unterstüt-

zung dieser Hypothese wird durch Demonstration der Benzodiazepin-Biosynthese bei Penicillium cyclopium (LUCKNER, 1984; WALLER und DERMER, 1981) gegeben. Ob die im Gehirn gefundenen Spuren an Benzodiazepinen letztendlich exogener oder endogener Herkunft sind, läßt sich wie bei den Morphinanen nur durch gezielte Experimente zu ihrer Biosynthese ermitteln. Während SANGAMESWARAN et al. (1986) eine Totalbiosynthese heterozyklischer Moleküle, welche ein Chloridatom enthalten, bei Mammalia für äußerst unwahrscheinlich halten, postuliert WILDMANN (1988), daß die Biosynthese von Diazepam und Lormetazepam bei den untersuchten Pflanzen im Keimungsstadium stattfindet.

"Sind die Benzodiazepine 100% Natur?" (MÜLLER, 1988), diese Frage ist noch offen. Ihre mögliche Funktion: *wozu* sie *wirken* ? ist noch völlig unbekannt. Beide Fragen sind hier aber gerade deshalb so brisant, weil man weiß:
Wie sie wirken .

Auf zellulärer Ebene wird die Wirkung der Benzodiazepine durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Dies wurde erstmals von der dänischen Arbeitsgruppe BRÆSTRUP und SQUIRES und der Baseler Arbeitsgruppe MÖHLER und OKADA 1977 nachgewiesen.

Der Begriff Rezeptor leitet sich vom Lateinischen *recipere* ab, welches als Aufnehmen zu übersetzen ist. Somit kann man Rezeptoren als Empfangs- oder Aufnahmeeinrichtungen von Zellen für den Empfang bestimmter Reize definieren (PSCHYREMBLE, 1982). Das Konzept, daß Stoffe ihre Wirkung über eine Interaktion auf molekularer Ebene mit suszeptiblen (empfindlichen, reizbaren) Zellstrukturen (FORTH et al., 1980) entfalten, geht auf LANGLEY (1878) zurück. PAUL EHRLICH formulierte bereits 1913: "Corpora non agunt nisi fixata" (Körper (Stoffe) wirken nur in gebundenem Zustand).

Eine direkte Untersuchung und Demonstration von Rezeptoren wurde erst durch Entwicklung von Radiorezeptorstudien (ROTH, 1973) möglich: "Receptors from Fiction to Fact", (ARIENS, 1979). Heute definiert man den Rezeptor als ein Membranzmolekül, welches durch Binden von chemischen Botenstoffen (z.B. Transmitter, Pharmaka) ein Signal empfängt und in eine Reizantwort (Stimulus, Hemmung eines Stimulus) umsetzen kann. Die Bindung einer Botensubstanz ist nur ein singuläres Ereignis, welches zur vollständigen Definition eines Rezeptors nicht ausreicht. Zusätzlich muß die spezifische Bindung für eine Kaskade von Folgereaktionen verantwortlich sein. Am Ende dieser Reaktionskaskade steht ein meßbarer biologischer Effekt, z.B. bei den Opiaten die Analgesie oder den Benzodiazepinen die Anxiolyse. (HÖLTJE, 1982)

Bei fast allen bisher untersuchten Vertebraten wurden Benzodiazepin-Rezeptoren im Zentralnervensystem nachgewiesen. Dort sind sie funktioneller Bestandteil eines multifraktionellen Komplexes, dem GABA-Rezeptor. GABA (Gamma-Amino-Butter-Acid) ist ein Neurotransmitter an wichtigen inhibitorischen Synapsen. Die Erregungshemmung durch GABA beruht auf einer Hyperpolarisation der Membran des Empfängerneurons durch vermehrten Einstrom von Chloridionen. Durch Benzodiazepine kann die Bindung von GABA an GABA-Rezeptoren und damit die Wirkung dieses Neurotransmitters moduliert werden. Bisher wurden endogene Liganden für den Benzodiazepinrezeptor nicht bekannt.

"Die Erkenntnis, daß dieser Rezeptor beim Schritt von den Nichtvertebraten zu den Vertebraten vor vielen hundert Millionen Jahren entstanden und seit dieser Zeit im zentralen Nervensystem unverändert beibehalten worden ist, hat schon sehr früh zu Spekulationen über eine mögliche physiologische Funktion dieses Systems geführt. Da die Evolution in der Regel ökonomisch arbeitet, werden in den

meisten Fällen Systeme, die nicht benötigt werden, wieder eliminiert." (MÜLLER,1988) Als mögliche endogene Liganden des Benzodiazepinrezeptors werden eine ganze Reihe verschiedener Substanzen diskutiert (MÜLLER,1988; GUIDOTTI et al., 1983; MAJEWSKA et al.,1986; NUTT,1988).

Ein Polypeptid DIB (Diazepam-Binding-Inhibitor) wurde aus dem Rattengehirn isoliert (GUIDOTTI et al.,1983). Die Autoren vermuten, daß es sich chemisch und funktionell vom endogenen Effektor der Benzodiazepinbindungsstelle ableitet und nicht selbst endogener Ligand ist. Die im Gewebe gefundenen Konzentrationen lassen auf eine mögliche in vivo Interaktion mit dem Rezeptor schließen. Allerdings besitzt DIB nur eine mäßige Rezeptoraffinität und zeigt im pharmakologischen Experiment angstausslösende und konvulsive Wirkungen (MÜLLER,1988). Inzwischen wird DIB als eine mögliche Vorstufe peptidartiger endogener Liganden diskutiert (COSTA, et al., 1984; MÜLLER,1988).

Die Frage nach dem endogenen Liganden für Opioidrezeptoren war erst Mitte der siebziger Jahre geklärt worden (HUGHES et al.,1975). Auch hier warf die Entdeckung der Opioidrezeptoren (TERENIUS,1973; PERT and SNYDER,1973a;SIMON et al.,1973) die Frage nach ihrer physiologischen Bedeutung auf. Die Vorstellung, daß diese Rezeptoren nur exogene Stoffe wie z.B. das Morphin selektiv binden würden, war unwahrscheinlich. Man begann auch hier nach endogenen Liganden zu suchen. HUGHES et al. (1975) isolierten zwei Pentapeptide, welche sich ausschließlich in der C-terminalen Aminosäure unterschieden: Leucin-Enkephalin (Try-Gly-Gly-Phe-Leu), Methionin-Enkephalin (Try-Gly-Gly-Phe-Met). Weitere Peptide, z.B. β -Endorphin (BRADBURY et al.,1976; COX et al.,1976) und Dynorphin A (GOLDSTEIN et al.,1981; CHAVKIN et al.,1982) mit höherem Molekulargewicht wurden entdeckt. Die Vielfalt der Opioidpeptide, Endorphine (endogene Morphine),entsteht

durch Spaltung hochmolekularer Vorläufer (HÖLLT, 1983): Pro-opiomelanocortin (NAKANISHI et al., 1979), Proenkephalin A (NODA et al., 1982), und Proenkephalin B (KADIKANI et al., 1982). Über die physiologische Bedeutung dieser verschiedenen Endorphine weiß man noch recht wenig.

Opiatrezeptoren befinden sich in verschiedenen Teilen des nozizeptiven Systems, des schmerzvermittelnden Systems des ZNS, an inhibitorischen Synapsen. Durch Endorphinbindung am Rezeptorprotein kommt es zu einer Hemmung der Adenylatzylase, welche die Ionenpermeabilität der Membran reguliert. Eine Weiterleitung von Schmerzimpulsen wird durch Erhöhung des Membranpotentials unterbrochen. Die präsynaptische Besetzung der Opiatrezeptoren durch Liganden mit Agonistenqualität hemmt über diesen Mechanismus die Freisetzung Schmerzimpuls übertragender Neurotransmitter.

Neben der Analgesie entfalten die Opiode unter der Therapie auch eine Entwicklung der Toleranz. Immer höhere Dosen sind erforderlich, um die Schmerzfreiheit aufrechtzuerhalten. Gleichzeitig kommt es bei chronischer Anwendung zur Ausprägung psychischer und physischer Abhängigkeit, zur Sucht. Aufgrund unterschiedlicher Wirkqualitäten einzelner Opiate stellte man die Einheitlichkeit der Opioidrezeptoren in Frage (DOLE et al., 1974). Die These der "multiplen Opioidrezeptoren" geht zurück auf GILBERT und MARTIN (MARTIN et al., 1976; GILBERT und MARTIN, 1976). Eine Einteilung der Rezeptoren erfolgt nach Präferenz einzelner Liganden für dieses spezifische Rezeptorprotein. Als μ -Rezeptoren bezeichnet man jene, an die Morphin spezifisch bindet. Die Ketocyclazocine sind Benzomorphan-Derivate, welche die Bindung an κ -Rezeptoren bevorzugen. N-Allyl-Normetazocin (SKF 10047) gilt als Prototyp des σ -Rezeptors. Der das Enkephalin bevorzugende Rezeptor der Vas deferens der Maus wird als δ -Rezeptor (LORD et al., 1977) bezeichnet.

Normalerweise bindet eine Substanz jedoch nicht nur an einen der genannten Opioidrezeptoren. Morphinbindung am μ -Rezeptor verursacht eine Atemdepression, die Bindung am κ -Rezeptor eine Sedation. Ein Präparat, das an verschiedenen Opioidrezeptoren bindet, kann durch einen selektiven Liganden diesem spezifischen Rezeptor gegenüber tolerant werden. Die volle Sensitivität gegenüber Rezeptoren, die eine andere Ligandenspezifität aufweisen, bleibt erhalten (SCHULZ et al., 1981; WÜSTER et al., 1981). Es ist ein Anliegen, die Wirkqualitäten Analgesie, Sucht und Toleranz durch Verwendung selektiv bindender Opioide voneinander zu trennen.

Die Kenntnis der Wirkqualität, "wozu" Stoffe "wirken" und "wie" Stoffe "wirken", hat man sich bei der Suche nach neuen Arzneimitteln zunutze gemacht.

Pflanzen-Zellkulturen als Quelle von aktiven Metaboliten bieten ein Maximum an Verschiedenheit expremierter Sekundärstoffbiosynthesen. Künstliche Laborbedingungen der Zellkultivierung schaffen unterschiedliche Muster natürlicher Produkte in unvorhersehbaren Kombinationen. Die Isolation von mehr als achtzig neuen Naturstoffen unterschiedlichster Struktur, z.B. Alkaloiden, Terpenen, Chinonen oder Phenylpropanen zeigt die biosynthetische Leistungsfähigkeit pflanzlicher Kallus- und Suspensionskulturen (RUYTER und STÖCKIGT, 1989). Aus Catharanthus roseus Suspensionskulturen konnten z.B. die Alkaloide 7-Hydroxy-Indolenin-Ajmalicin und das Pseudoindoxyl-Ajmalicin isoliert werden (PETIARD et al., 1982), aus der Suspensionskultur der Apocynaceae Voaacanga africana Voafrin A und Voafrin B (STÖCKIGT et al., 1983).

Zahlreiche weitere Beispiele für Sekundärmetabolite (IKUTA und ITOKAVA, 1988), welche ausschließlich in pflanzlichen Zellkulturen gefunden wurden, werden vorgestellt (RUYTER und STÖCKIGT, 1989).

Zur Findung neuer pharmakologisch interessanter Strukturen können zwei grundlegend verschiedene Wege beschritten werden. Eine Isolation von Hauptkomponenten und nachfolgende Testung auf spezifische biologische Aktivitäten führt häufig zur Identifizierung wenig brauchbarer Produkte. In der Regel werden Sekundärmetabolite bei pflanzlichen Zellkulturen in nur geringen Konzentrationen gebildet. Ein anderes Konzept, welches sich primär an der biologischen Aktivität orientiert, hat den Vorteil, weniger interessante Objekte auszu sondieren. Das "principium activum" gibt eine Orientierung zu kontrollierter Metabolitisolation, -reinigung und -charakterisierung.

Erfolgreiche Verwendung solcher in vitro Testsysteme für eine gezielte Naturstoffisolation ist belegt (ARENS et al., 1982; ARENS et al., 1985; ARENS et al., 1986). Podoverin A, B und C wurden aus Extrakten von Podophyllum versipelle Kalluskulturen isoliert. Ein Maus-Makrophagen-Chemilumineszenz Assay (PARNHAM et al., 1983) erlaubte die Selektion der drei anti-inflammatorisch wirkenden Flavonoide (ARENS et al., 1986). Auch aus Plagiorhegma dubium konnten anti-inflammatorisch wirkende Verbindungen unter Verwendung eines anderen Detektionssystems isoliert werden (ARENS et al., 1985). Das Opiatrezeptor aktive Indolalkaloid Pericin fand man bei Picralima nitida Suspensionskulturen (ARENS et al., 1982).

Wie am Beispiel der Opiode und Benzodiazepine belegt ist, besitzen die sie bindenden Rezeptoren eine hohe Selektivität und Sensitivität gegenüber ihren spezifischen Liganden.

Insofern liefern Rezeptorbindungsstudien, in welchen die Verdrängung radioaktiv markierter Liganden vom Rezeptor durch nicht markierte Konkurrenten ermittelt wird, ein geeignetes in vitro Testsystem als Werkzeug der Wirkstoff-Detektion in einem Pool verschiedenster Stoffe. Die hohe Selektivität erlaubt, das "principium activum" in einer Mischung von Haupt- und Spurenmetaboliten im Rohextrakt zu identifizieren. Durch eine hohe Empfindlichkeit des Testsystems können auch in Spuren vorhandene Metabolite erkannt werden mit Bezug auf ihre Bedeutung für die gegebene Zielindikation. Eine Grundvoraussetzung für das Wiederfinden solcher Substanzen beim Isolations- und Reinigungsvorgang ist die äußerste Zuverlässigkeit des vorliegenden Testsystems. Die vorhandene Aktivität einer Substanz in definierter Konzentration kann in dieser Konzentration reproduziert werden.

Gleichzeitig setzt die hohe Sensitivität und Selektivität der Rezeptorbindungsstudien voraus, daß eine große Kollektion an Pflanzenzellkulturen getestet werden muß, um aus einem großen Stoffangebot die wenigen mit der gesuchten Qualität zu finden. Die Ermittlung der Verdrängung der Radioliganden am Rezeptor bietet ein System, bei welchem in kurzer Zeit ein großer Probenumfang analysiert werden kann. Aber nicht nur die Verwendung eines speziellen in vitro Testsystems ist entscheidend, sondern auch die Auswahl der zu untersuchenden Objekte.

Von etwa 250.000 Pflanzen, die zu den Angiospermen zählen, werden weniger als 10% als Arzneipflanzen genutzt. Von den Pflanzen, welche nicht als Phytopharmaka in irgendeiner Form Verwendung finden, ist wenig über mögliche medizinisch interessante Inhaltsstoffe bekannt. Das oben geschilderte Beispiel des diskutierten Benzodiazepin-Vorkommens in der Natur sei hier erwähnt. Viele Pflanzen mit Charakteristika

wie edemisches und seltenes Vorkommen oder solche, die unter Naturschutz stehen, oder aufgrund morphologischer Merkmale eine begrenzte Verfügbarkeit besitzen, können unter Verwendung biotechnologischer Verfahren eine Quelle neuer aktiver Strukturen darstellen.

In der vorliegenden Arbeit bieten Kalluskulturen von Pflanzenarten, welche bisher wenig bearbeitet sind und aus der gesamten Welt stammen, die in nicht allzu großen Mengen gesammelt werden können, ein reiches Angebot zur Untersuchung auf bisher unbekannte rezeptoraktive Metabolite. Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsstudien als in vitro Testsysteme bei Pflanzenzellkulturen wurden aufgrund der dargelegten aktuellen Problematik für beide Substanzklassen gewählt.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. BIOLOGISCHES MATERIAL:

1.1. Pflanzliches Material

1.1.1. Differenzierte Pflanzen

Samen von Phaseolus radiatus L. (Phaseolus aureus Roxb., Vigna radiata (L.) R. Wilczek / "Katjang Idjoe", Connimex Baarn, Niederlande) wurden in Plastiktöpfen ($\varnothing = 24$ cm) in einem Gemisch aus Torf, Kompost, Waldhumus, Sand und Lehm (1:1:1:1:1) Anfang April ausgesät. Die Keimung erfolgte im Gewächshaus (20°C, 60-70% Luftfeuchtigkeit) bei künstlicher



Abb. 1 Blühende Phaseolus radiatus Pflanze aus der
Institutsgärtnerei

Belichtung (12 h, 2000 lux). Nach 10 Tagen wurden die Pflanzen im Freien (3.Stock, Innenstadt München) weitergezogen bis zur Blütezeit bzw. einsetzenden Fruchtbildung (Ende Juli). (vergl.Abb.1)

1.1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Es wurden sowohl Kalluszellkulturen als auch Suspensionskulturen aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie verwendet.

Die Kultivierung der Kalli und suspendierten Zellen erfolgte in jeweils verschiedenen Nährmedien:

- LS -Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965)
- DAX -Medium nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert nach ZENK et al. (1975)
- B5C2-Medium nach GAMBORG et al. (1968)
- 4X -Medium nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert nach ZENK et al. (1977).

Diesen Medien wurde bei Verwendung für eine Kallusanzucht Agar (Agar-Agar, Merck Best.Nr. 1614) in einer Konzentration von 1% zugesetzt.

Die Kultivierung suspendierter Zellen von Bocconia cordata und Phaseolus radiatus erfolgte in Erlenmeyer-Kolben verschiedener Volumina (300 ml Kolben mit 75 ml LS-Medium, 1l Kolben mit 250 ml LS-Medium, 1,5l Kolben mit 750 ml LS-Medium) auf Rotationsschüttlern (100 Upm). Die Anzucht wurde im Dauerlicht (600 lux) bei 23°C durchgeführt. In einem Tonus von 7 Tagen wurde jeweils die Subkultivierung vorgenommen.

1.2. Pilzmaterial

Das Produkt "Hefe DHW Vital Gold" der deutschen Hefewerke Hamburg/Nürnberg ist eine im Einzelhandel erhältliche Bäckerhefe, Saccharomyces cerevisiae. Das im Institut autoklavisierte Produkt wurde verwendet.

Bei dem als "Hefe-Elicitor" bezeichneten Pilzmaterial handelt es sich um ein Präparat, welches nach einer Arbeitsvorschrift von KOCOUREK und BALLOU (1969) aus der Zellwand von Saccharomyces cerevisiae gewonnen wurde. Frau H. Gundlach stellte eine Probe des Präparats zur Verfügung (Herzlichen Dank!).

1.3. Versuchstiere

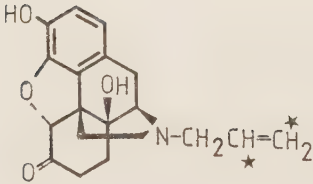
Sprague Dawley Ratten beiderlei Geschlechts (150-220g) wurden bezogen bei Interfauna Süddeutsche Versuchstierfarm GmbH & Co KG. Die Tiere wurden im Walther-Straub Institut für Pharmakologie in München unter vorschriftsgemäßen Bedingungen für Labortiere gehalten.

Die Sektion von Kalbsuteri erfolgte im Städtischen Schlacht- und Viehhof München unter Aufsicht dort tätiger Veterinärmediziner.

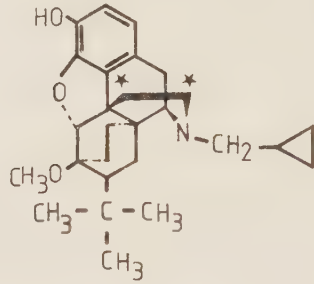
2. SPEZIELLE CHEMIKALIEN:

Radioliganden für Opiat-Rezeptorbindungsstudien wurden bezogen bei Amersham Buchler GmbH & Co KG (Braunschweig).

Für den Opiat-Rezeptortest verwendete Radioliganden:

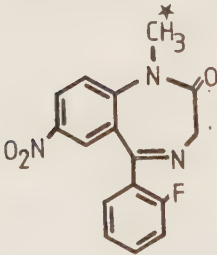


[N-allyl-2,3-³H]Naloxon
(42 Ci/mmol)



[15,16-³H]Diprenorphin
(40 Ci/mmol)

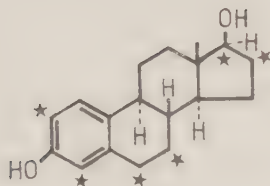
Für den Benzodiazepin-Rezeptortest verwendeter Radioligand wurde ebenfalls bezogen bei Amersham Buchler GmbH & Co KG (Braunschweig):



[N-methyl-³H]Flunitrazepam
(84 Ci/mmol)

Für den Östrogen-Rezeptortest verwendeter Radioligand wurde

bei DuPont de Nemour GmbH, NEN Research Products (Dreieich) bezogen:



[2,4,6,7,16,17-³H]17β-Oestradiol
(166 Ci/mmol)

Diprenorphin wurde von Herrn Prof. Dr. A. Herz, Max-Planck-Institut für Psychiatrie (Martinsried), Clonazepam von Herrn Dr. H.O.Borbe, Nattermann & Cie. GmbH (Köln) bereitgestellt; (hier einen herzlichen Dank!). Diethylstilböstrol, 17α - und 17β-Oestradiol wurden bei Sigma bezogen.

Ebenfalls bei Sigma bezogen wurden Aktivkohle, Dextran 70 sowie β-Glucosidase (β-D-Glucoside Glucohydrolase).

Zur Filtration wurden Glasfiberfilter der Firma Whatman benutzt: "Whatman Glass Microfiberfilter" (= 2,5 cm; GF/B).

Als Referenzen wurden Coumestrol und Sanguinarin bei der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Chelerythrin, Macarpin, Magnoflorin und Jatrorrhizin wurden mir von Frau Dr. M. Rüffer und Herrn Dr. H.- M. Schumacher als Referenzen überlassen.

Prof. Dr. W. Barz, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen (Westfälische Wilhelms-Universität Münster), stellte Biochanin A, Coumestrol, Daidzein und Daidzin (Daidzein-7-Glucosid), Formononetin, Genistein, (-) Maackiain, (-) Medicarpin und (+/-) Medicarpin, Pratensein und Pterocarpin zur Verfügung.

Prof. Dr. H. Wagner, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie (Ludwig-Maximilians-Universität München), überließ mir verschiedene Wedelolacton-Derivate, Prunetin, Apigenin.

Lupinalbin A stammt von Frau Dr. M.J. O'Neill, Department of Pharmacocnoso, School of Pharmacy (University of London).

Meinen besten Dank allen großzügigen "Lieferanten" für die zur Verfügungstellung der genannten Sekundärmetabolite!

3. GERÄTE:

Für rezeptorologische Methoden wurden folgende Geräte verwendet:

pH-Meter:	Digitalmeter Modell Digi 610 (WTW, Weilheim)
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge Sorvall RC 58 (DuPont, USA) Rotor Typ SS 34
	Ultrazentrifuge Beckman Spinco L2 (Beckman, München), Rotor Typ 50 Ti
	Kühlzentrifuge Hettich Rotanta/ RP (Hettich, Tuttlingen)
	Tischzentrifuge 5412 (Eppendorf, Hamburg)

Filtrationsgerät: Nach dem Prinzip der Filtrationstöpfe (Millipore) nachgebautes Gerät, mit dem gleichzeitig 48 Proben filtriert werden konnten

Scintillationszähler: Betaszint BF 5004 (Berthold, Wildbad)

Für analytische Methoden benutzte Geräte:

Spektralphotometer: Uvikon 810 (Kontron, Schweiz)

Massenspektrometer: Quadrupolmassenspektrometer Modell MAT 44S (Finnigan) mit kombinierter EI/CI-Einrichtung (70 eV/ 180 eV)

NMR-Spektrometer: NMR-Spektrometer Modell AM 360 (Bruker)

HPLC-Anlage: Bestehend aus folgenden Geräten: zwei HPLC-Pumpen Modell 510, einem Gradientensteuergerät Modell 680, einem automatischen Probengeber Modell Wisp 710B, einem Photometer Modell Lambda-Max 481 und dem Integrator Modell Data Module 740 (Millipore/ Waters, Eschborn)

Für präparative Methoden verwendete Geräte:

Gefriertrocknung: im Labormaßstab mit einer Gefriertrocknungsapparatur von Edwards, bei größeren Mengen (10 kg) eine Anlage Modell Epsilon II (Christ)

Durchflußphotometer: Biochemical UV Monitor Modell 150
(Altex)

Schreiber: Potentiometerschreiber Servogor S (BBC
(Brown Boveri)/Goerz)

HPLC-Anlage: Bestehend aus folgenden Geräten: einer
HPLC-Pumpe Modell M 600, einem Gradienten-
steuergerät Modell 680, einem Rheodyne-Ventil
Modell, einem Photometer Modell Lamda Max 481
und einem Integrator Modell Data Module 740
(Millipore/ Waters, Eschborn)

4. REZEPTOROLOGISCHE METHODEN:

4.1. Bindungsstudien an Membranrezeptoren

Opiatrezeptor-Bindungsstudien wurden nach einer von PERT und SNYDER (1973b) beschriebenen Methode etabliert. Der Ermittlung der Benzodiazepinrezeptor-Bindung liegt eine Technik von SQUIRES und BRÆSTRUP (1977) zugrunde. Beide Verfahren wurden modifiziert und im weiteren in der beschriebenen Weise durchgeführt.

Membranpräparation

Sprague Dawley Ratten wurden decapitiert, das Cerebrum präpariert. Cortex und Cerebellum wurden getrennt. Das Gewebe wurde bei -75°C gelagert. Cortex wurde in 10 ml eiskaltem Puffer homogenisiert (Ultra Turrax Homogenisator, T 18/10, 20.000 min⁻¹, 10 sec). Es wurden folgende Puffer verwendet:

Puffer A

50 mM Tris-HCl-Puffer, pH = 7,4
(Opiatrezeptor-Präparation)

Puffer B

50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH = 7,4
(Benzodiazepinrezeptor-Präparation).

Das Homogenat wurde zentrifugiert (48000xg, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 10 ml des jeweiligen Puffers (s.o., 4°C) resuspendiert. Diese konzentrierte Membranpräparation wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -75 °C gelagert.

Opiatrezeptor-Bindungsassay:

Vorbereitete Membranpräparationen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Mit Puffer A wurde eine Konzentration von etwa 6,5 mg FG pro ml eingestellt. Für Bindungsstudien methanolischer Extrakte aus Kallusgewebe wurde [³H]-Naloxon, für alle weiteren Bindungsstudien -sofern nicht anders unter III. angegeben- [³H]-Diprenorphin als Radioligand verwendet. Die einzelnen Komponenten des Bindungsassays sowie Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Zugabe des Membranhomogenats erfolgte zuerst, die des Radioliganden zuletzt.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung (vergl.II.4.3.) wurden jeweils die unmarkierten Liganden statt der Testlösung eingesetzt, d.i. Naloxon und Diprenorphin (jeweils 10⁻⁵M im Assay).

	[³ H]NALOXON	[³ H]DIPRENORPHIN
Membranhomogenat [ml]	1,00	1,00
Radioligand [nM]	0,50	0,20
Testlösung [ml]	0,05	0,05
Inkubationsvolumen [ml]	1,10	1,10
Inkubationstemperatur [°C]	37	30
Inkubationsdauer [min]	15	120

TABELLE 3: Zusammensetzung und Inkubationsbedingungen des Opiatrezeptor-Bindungsassays unter Verwendung von [³H]Naloxon und [³H]-Diprenorphin als jeweilige Radioliganden, deren Konzentrationsangabe sich auf die im Assay erreichte Konzentration bezieht (vergl. spezifische Aktivität der Radioliganden II.2.; 1 µCi = 2,22 x 10⁶ dpm). Lösungsmittel für die Radioliganden war H₂O.

Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay

Das tiefgekühlte Membranhomogenat wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. 8,7 mg FG pro ml wurden mit Puffer B (0,1 M Na-Ascorbat) eingestellt. Bei Durchführung der Kontrollversuche mit Clonazepam und der Bindungsstudien bei methanolischen Extrakten wurde dem Puffer kein Ascorbat zugesetzt. Als Radioligand wurde ausschließlich [³H]Flunitrazepam verwendet. Tabelle 4 gibt Auskunft über die einzelnen Komponenten des Bindungsassays sowie die Bedingungen der Inkubation. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe des Radioliganden gestartet.

Die unspezifische Bindung wurde hier in Anwesenheit von Clonazepam (10⁻⁵ M im Bindungsassay) statt einer Testlösung ermittelt (vergl. II.4.3.).

Membranhomogenat	1,00	[ml]
Radioligand	0,40	[nM]
Testlösung	0,05	[ml]
Inkubationsvolumen	1,10	[ml]
Inkubationstemperatur	4	[°C]
Inkubationsdauer	30	[min]

TABELLE 4: Zusammensetzung und Inkubationsbedingungen des Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassays unter Verwendung von [³H]FLU als Radioliganden, dessen Konzentrationsangabe sich auf die im Bindungsassay erreichte Konzentration bezieht (vergl. spezifische Aktivität von [³H]FLU unter II.2.; 1 µCi = 2,22 x 10⁶ dpm). Lösungsmittel für [³H]FLU war H₂O.

Die Gesamtbindung zugeführter Radioliganden wurde in beiden Membranrezeptor-Bindungstests durch Zugabe des jeweiligen Puffers statt der Testlösung ermittelt. Darüberhinaus wurde der Einfluß verwendeter Lösungsmittel erprobt, indem das Lösungsmittel selbst als Testlösung eingesetzt wurde. Da vor allem Methanol bei Extraktionen und als Lösungsmittel aktiver Sekundärmetabolite unentbehrlich blieb, jedoch eine etwa 20% ige Hemmung der [³H]FLU-Bindung zeigte, wurde hier die Berechnung der Gesamtbindung entsprechend II.4.3. modifiziert. Auf die Bindung der Radioliganden des Opiatrezeptors konnte bei Zugabe von 0,05 ml Methanol kein Einfluß von Methanol nachgewiesen werden.

Die Inkubation der Membranrezeptor-Bindungsassays wurde durch Vakuumfiltration beendet. Dabei kommt es zu einer Trennung der membrangebundenen Radioliganden vom ungebundenem Anteil der markierten Verbindungen. Glasfibrerfilter geringer Porengröße (Whatman GF/B) halten die mit Radioligand

besetzten Membranen zurück. Die Filter mit den Membranen wurden jeweils 4 mal mit 2 ml des entsprechenden Puffers (Puffer A oder Puffer B) nachgewaschen.

Zur Bestimmung der Radioligandbindung wurden die Filter mit dem an die Membran gebundenen Anteil des Radioliganden in Szintillationsgläschen überführt. Nach Trocknung der Filter bei Raumtemperatur (ca. 2-3 h) wurden jeweils 5 ml Szintillator (Rotiszint, Roth) zugegeben. Die Radioaktivität der Proben [cpm] wurde nach kräftigem Schütteln mit einer Zählausbeute von 40% im Szintillationszähler gemessen.

4.2. Bindungsstudien bei Östrogenrezeptoren

In Anlehnung an eine von LEE et al. (1977) beschriebene Methode wurde der Östrogen-Bindungstest modifiziert und am Lehrstuhl etabliert.

Östrogenrezeptor-Präparation

Kalbsuteri mit einem Gewicht von weniger als 30 g wurden vom Bindegewebe befreit und sogleich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde unter Stickstoff-Kühlung in einem Mörser pulverisiert. Unter Verwendung eines Ultra Turrax Homogenisators (T 18/10, 20.000 min⁻¹, 15 sec) wurde in T-Puffer (5 ml pro g FG) ein Homogenat hergestellt.

T-Puffer

40 mM Tris-HCl-Puffer, pH = 7,4
(10% Glycerin, 1 mM Dithiothreitol)

Das Homogenat wurde zentrifugiert (100000xg (vergl. II.3.), 4 °C, 1 h). Die Cytosol-Fraktion -der Östrogenrezeptor ist

ein cytoplasmatischer Rezeptor(!)- wurde einem ersten Reinigungsschritt unterzogen durch eine 30% Sättigung mit Ammoniumsulfat. Nach Zentrifugation (20000xg, 4 °C, 10 min) wurde das Sediment in T-Puffer resuspendiert (0,2 g FG/ ml Puffer). Diese Rezeptorfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -75 °C höchstens vier Wochen gelagert.

Östrogenrezeptor-Bindungsassay

Die Rezeptorfraktionen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Cytosolfraktion wurde zuerst, [³H]17β-Östradiol wurde als Radioligand zuletzt zum Bindungsassay (Tabelle 5) appliziert.

Cytosolfraktion	0,20	[ml]
Radioligand	0,40	[nM]
Testlösung	0,05	[ml]
Inkubationsvolumen	0,30	[ml]
Inkubationstemperatur	8	[°C]
Inkubationsdauer	16-18	[h]

TABELLE 5: Zusammensetzung und Inkubationsbedingungen des Östrogenrezeptor-Bindungsassays. Die Konzentrationsangabe für den Radioliganden bezieht sich auf die im Bindungsassay erreichte [³H]17β-Östradiol-Konzentration(vergl. spezifische Aktivität von [³H]17β-Östradiol unter II.2.; 1 pCi = 2,22 x 10⁶ dpm). Lösungsmittel für den [³H]17β-Östradiol war H₂O.

Die Inkubation des Östrogenrezeptor-Bindungsassays wurde durch Zugabe von 0,1 ml einer wäßrigen Aktivkohlesuspension beendet.

Aktivkohlesuspension

T-Puffer

0,5% Aktivkohle

0,05% Dextran 70

Nach 10 min wurde zentrifugiert (2000xg, 4 °C, 10 min). Vom klaren (!) Überstand wurden 0,1 ml Proben entnommen. Jeweils 5 ml Szintillator (Rotiszint, Roth) wurden verwendet zur nachfolgenden Bestimmung der Radioaktivität (vergl. II.4.1.).

Die Gesamtbindung wurde bestimmt durch Inkubation der Rezeptorfraction mit [³H]17β-Östradiol in Anwesenheit von T-Puffer an Stelle einer Testlösung. Die im Überstand frei verbleibende Menge an Radioligand wurde ermittelt durch Inkubation von [³H]17β-Östradiol in Anwesenheit von 0,2 ml T-Puffer statt 0,2 ml Rezeptorfraction (Berechnung der spezifischen Bindung: vergl. II.4.3.).

4.3. Berechnung rezeptorologischer Ergebnisse

Bei den vorliegenden Rezeptorbindungsstudien handelt es sich um sogenannte Hemmungsexperimente ("displacement" Experimente), wobei die Bezeichnung "displacement" nicht ganz korrekt ist. Hier befinden sich drei Komponenten in Wechselwirkung: der Rezeptor R, der Radioligand L und der unmarkierte Ligand I. Radioligand L und unmarkierter Ligand I konkurrieren um die Bindung am Rezeptor R. Der Radioligand wird also nicht verdrängt, sondern besitzt in Anwesenheit unmarkierter Liganden Konkurrenz um seinen Bindungsplatz am Rezeptor. (REPKE und LIEBMANN, 1987)



RL = Rezeptor-Radioligand-Komplex

RI = Rezeptor-Inhibitor-Komplex (Inhibitor = unmarkierter Ligand)

Im Hemmungsexperiment bleibt die totale Konzentration an Radioligand [Lr] konstant. Gemessen wird die Konzentration des Rezeptor-Radioligand-Komplexes [RL], welche sich in Abhängigkeit der Konzentration des konkurrierenden unmarkierten Liganden [I] befindet. Durch eine Erhöhung der Konzentration des unmarkierten Konkurrenten [I] kommt es zu einer vermehrten Bildung von RI, während [RL] abnimmt. Die Konzentration an freiem Radioligand [L] (=F) nimmt dann zu, unter der Voraussetzung, daß [Lr] konstant ist.

Für verschiedene Konzentrationen des unmarkierten konkurrierenden Liganden wird [RL] bestimmt. Der Ausgangswert ohne Inhibitor ([I] = 0) wird 100% gesetzt. Die Konzentration [I], bei welcher 50% [RL] erreicht werden, wird als IC₅₀-Wert bezeichnet. Der IC₅₀-Wert ist die Inhibitorkonzentration, bei welcher die spezifische Radioligand-Bindung 50% beträgt; sie ist ein Maß der Affinität des Liganden zum Rezeptor. Je geringer die Konzentration des unmarkierten Liganden ist, um den IC₅₀-Wert zu erreichen, desto größer ist seine Affinität zum Rezeptor.

Es gibt grundsätzlich zwei Wege diesen IC₅₀-Wert zu ermitteln. Einmal ist es möglich, diesen Wert aus der von CHENG und PRUSOFF (1973) erstellten Beziehung

$$K_i = IC_{50} / (1 + F/K_D)$$

zu berechnen. Dabei bezeichnet K_i die Dissoziationskonstante des Inhibitors, K_D die Dissoziationskonstante des Radioliganden und F die Konzentration des freien Radioliganden.

Eine andere, hier verwendete Methode ist eine Bestimmung des IC₅₀-Werts aus der Linearisierung sigmoidaler Hemmungskurven über eine logit-Transformation.

Es gilt:

$$\text{logit (P)} = \ln (P / (100-P))$$

P symbolisiert dabei den prozentualen Anteil von [RL] an der totalen Konzentration der Rezeptoren [R_r]. Bei P = 50 wird logit = 0; diese Konzentration, bei der P = 50 ist, wird als IC₅₀-Wert bezeichnet. (REPKE und LIEBMANN, 1987) Aus dem logit-log-Plot kann dieser Wert graphisch ermittelt werden. Diese Bestimmungsart wurde hier vorgenommen.

Um die spezifische Bindung des Radioliganden zu bestimmen, wurde jeweils der für die unspezifische Bindung erhaltene cpm-Wert subtrahiert.

Ermittelte cpm-Werte von Proben, welchen statt einer Testlösung, d.h. möglichen Konkurrenzliganden, Puffer zugegeben wurde, wurden als Gesamtbindung bezeichnet. Durch Subtraktion des cpm-Werts der unspezifischen Bindung konnte der cpm-Wert ermittelt werden, welcher einer 100% spezifischen Bindung entsprach. Durch Bezug auf diesen Wert konnten die entsprechenden Prozentsätze von [RL] in Anwesenheit von Konkurrenzliganden bestimmt werden aus dem jeweilig errechneten cpm-Wert der spezifischen Bindung. Diese Werte wurden halblogarithmisch in der "displacement"-Kurve dargestellt.

Abb.2 zeigt eine solche Hemmungskurve, die im Opiatrezeptor-Bindungsassay für Diprenorphin und Naloxon ermittelt wurde. Die logit-Transformation dieses Verdrängungsexperiments ist in Abb.3 dargestellt, als ein Beispiel der graphischen Ermittlung des IC₅₀Werts.

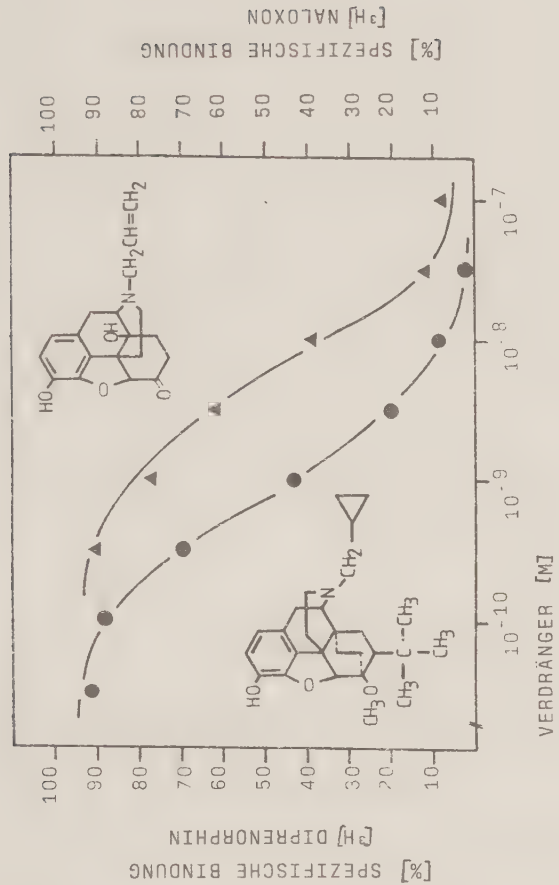


Abb. 2 Verdrängung spezifisch gebundenen [³H]Diprenorphin durch Diprenorphin (●) und spezifisch gebundenen [³H]Naloxon durch Naloxon (▲) im Opiatrezeptor-Bindungsassay; Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Zu den Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3

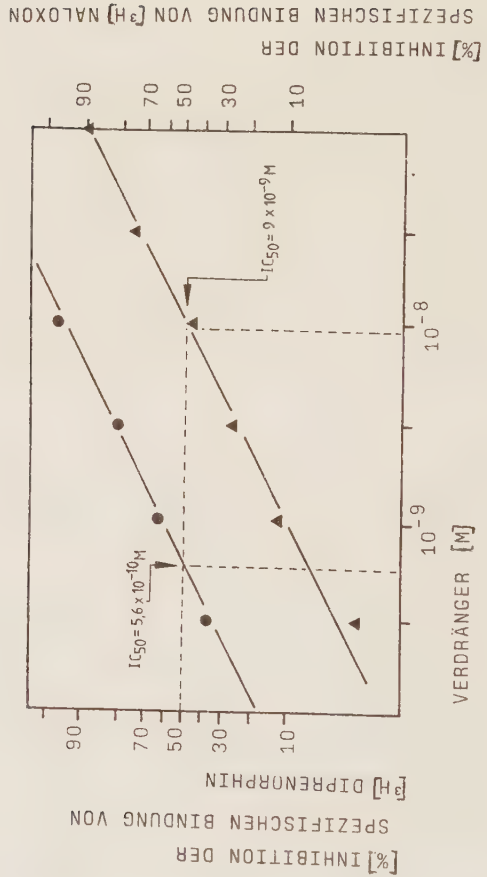


Abb. 3 logit-log-Plot für die Verdrängung spezifisch gebundenen $[^3\text{H}]$ Diprenorphin durch Diprenorphin (●) und spezifisch gebundenen $[^3\text{H}]$ Naloxon durch Naloxon (▲) im Opiatrezeptor-Bindungsassay; Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3

Etwas komplizierter ist die Ermittlung der "displacement"-Kurve und des entsprechenden IC₅₀-Werts beim Vorliegen eines Einflusses von Lösungsmitteln auf die Bindung des Radioliganden am Benzodiazepinrezeptor. Methanol blieb als Lösungsmittel unerläßlich; es verminderte jedoch die Bildung von RL um etwa 20%, sodaß bei definierter Radioligandmenge (II.4.1.) in Anwesenheit von Methanol maximal nur noch eine [RL] von 80% erreicht werden konnte (vergl. Abb.4). Dies wurde so interpretiert, daß bei gegebener [L], hier 0,4 nM [³H]FLU, die maximal erreichbare spezifische Radioligandbindung vermindert ist, so daß für diesen speziellen Fall für die spezifische Gesamtbindung gilt:

$$100\% [\text{RL}]_{-\text{MeOH}} = 80\% [\text{RL}]_{+\text{MeOH}}$$

Im konkreten bedeutet dies, daß der cpm-Wert für die Gesamtbindung in Gegenwart von Methanol bestimmt wurde (vergl. Abb.4).

Die halblogarithmische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve sowie ihre logit-Transformation werden zur Bestimmung des IC₅₀-Werts nicht nur beim Membranrezeptor, sondern auch beim cytoplasmatischen Östrogenrezeptor verwendet. Abb. 5 zeigt solche sigmoidalen Hemmungskurven und den entsprechenden logit-log-Plot für Diethylstilböstrol und 17β-Östradiol. Die Abbildung verifiziert die Brauchbarkeit des etablierten Östrogenrezeptor-Bindungsassays für entsprechende "displacement"-Experimente (vergl. NELSON et al., 1984; LEE et al., 1977).

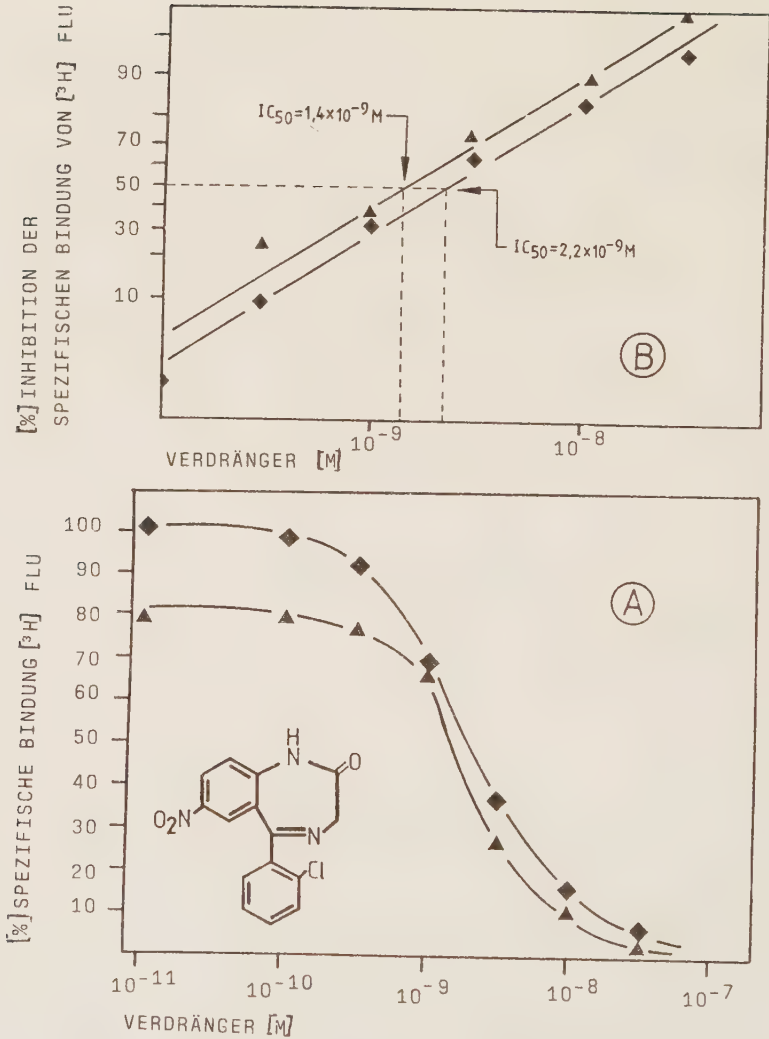


Abb. 4 Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{FLU}$ durch Clonazepam (◆) in Gegenwart von Methanol (▲) im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay; A: halblogarithmische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve; B: logit-Transformation; Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4

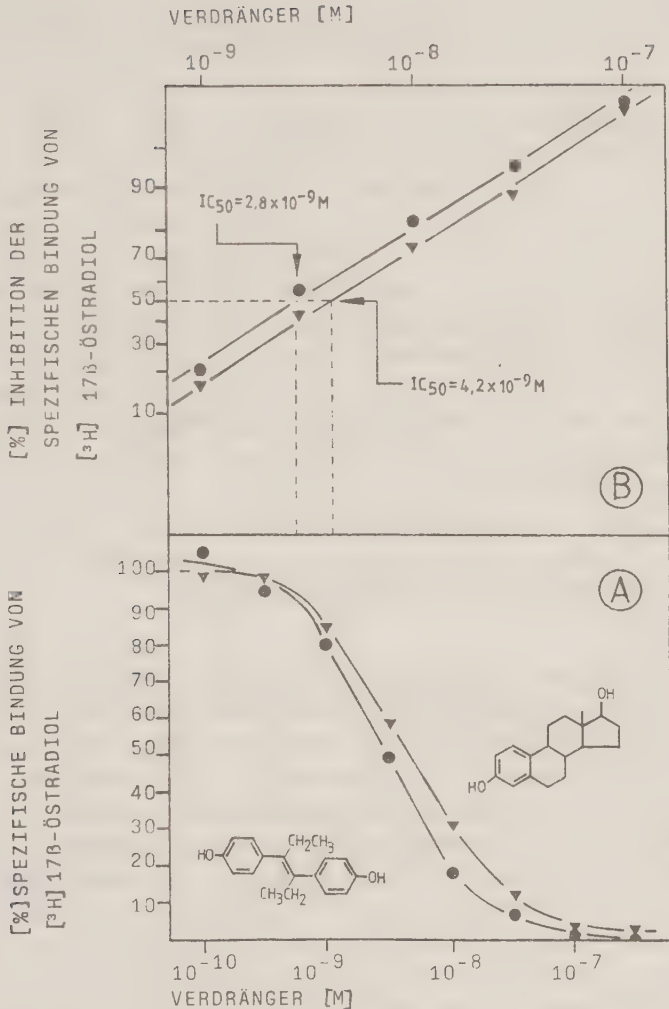


Abb. 5 Verdrängung von $[^3\text{H}]$ 17 β -Östradiol durch 17 β -Östradiol (▼) und Diethylstilböstrol (●) im Östrogenrezeptor-Bindungsassay; A: sigmoidale Hemmungskurve; B: logit-log-Plot; Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 5

5. AUFARBEITUNG VON ZELLKULTUR-MATERIAL:

5.1. Extraktion aus Kallusgewebe

Kalli (1g FG) von mehr als 500 verschiedenen Kallusspezies (vergl. III.1.1.) wurden bei -20 °C für einige Tage gelagert. Anschließend wurde das Gewebe in Methanol (0,2g FG/ml) bei 40 °C über Nacht (ca. 14 h) extrahiert. Mit Hilfe eines Glasstabs wurde das Gewebe mazeriert, und erneut das Verhältnis 0,2g Kallusgewebe pro ml Methanol eingestellt. Es wurde zentrifugiert (1000 Upm, RT, 2 min) und 0,05 ml (ca. 1,2 mg TG) des klaren (!) Überstands im Opiat- und Benzodiazepinrezeptor- Bindungsassay (vergl. Tabellen 3 und 4) verwendet.

5.2. Extraktion aus suspendiertem Gewebe

Durch Vakuum-Filtration wurde das Gewebe über einen Büchner-Trichter vom Kulturmedium abgetrennt. Zur Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts wurde entweder eine Gewebeprobe entnommen und das Trockengewicht nach Trocknung der Zellen bei 40 °C (Trockenschrank) bestimmt. Zur präparativen Aufarbeitung wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zunächst bei -20 °C gelagert. In diesem Fall wurde das Zelltrockengewicht erst nach einer anschließenden Gefriertrocknung bestimmt.

Zur präparativen Aufarbeitung wurde eine definierte Menge des gefriergetrockneten Gewebes von Bocconia cordata unter Verwendung eines Soxhlet in Methanol bei 50 °C für ca. 8 h extrahiert. Zur methanolischen Extraktion wurde lyophylli-

siertes Gewebe von Phaseolus radiatus nach erfolgter Gewichtsbestimmung bei Raumtemperatur unter Rühren über Nacht extrahiert. Dabei war jeweils das Verhältnis von Lösungsmittel- zu Gewebenvolumen etwa 1:5. Der methanolische Rohextrakt wurde über einen Büchner-Trichter durch Vakuum-Filtration abgetrennt und nach Probenentnahme am Rotationsverdampfer konzentriert.

Im Fall einer vorhergehenden Autolyse glykosidisch gebundener Sekundärmetabolite wurde zur präparativen Aufarbeitung eine definierte Menge des tiefgefrorenen Gewebes bei Raumtemperatur über 2-3 Tage in Wasser suspendiert. Das Verhältnis von Gewebe- zu Wasservolumen betrug dabei etwa 1:2. Das Gewebe wurde nachfolgend vom Wasser durch Vakuum-Filtration abgetrennt und in der oben beschriebenen Weise methanolisch extrahiert. Sowohl der Wasser- als auch der methanolischen Fraktion wurde je eine Probe entnommen.

5.3. Applikation biotischer und abiotischer Agentien zum Kulturmedium

Suspendierte Zellen von Phaseolus radiatus wurden nach fünf Tagen der Subkultivierung unter sterilen Bedingungen über einen Büchner-Trichter vom Kulturmedium abgetrennt. In 25 ml LS-Medium wurden 4 g Zellen suspendiert. Im Anschluß an die Inoculation wurden biotische und abiotische Agentien unter Wahrung der Sterilität appliziert (vergl. III.3.7.). Die Zugabe verschiedener Cadmiumnitrat-Konzentrationen (vergl. III.3.7.) erfolgte erst zwei Tage nach Inoculation. Nach der Applikation wurden die suspendierten Zellen unter den in II.1.1.2. angegebenen Bedingungen für zwei Tage kultiviert.

6. AUFARBEITUNG DIFFERENZIERTER PFLANZEN:

Von blühenden Phaseolus radiatus Pflanzen wurden folgende Organe geerntet:

Laubblatt, Stengel, Wurzel, Blüte, Hülse und Samen

Die einzelnen Organe wurden in Methanol mit einem Ultra Turrax Homogenisator ($T\ 18/10$, $20.000\ \text{min}^{-1}$) zerkleinert. Es wurden jeweils 50 mg FG des jeweiligen pflanzlichen Organs in 5 ml Methanol bei $40\ ^\circ\text{C}$ über Nacht extrahiert. Nach der methanolischen Extraktion wurde der Extrakt jeweils auf 1,4 mg (TG) Organgewebe pro ml Lösungsmittel eingestellt. Vor Probenentnahme wurde zentrifugiert (2000 Upm, RT, 2 min). Nur der klare(!) Überstand wurde verwendet (Benzodiazepin-rezeptor-Bindungsassay/Tabelle 4; HPLC- und DC-Analyse vergl. II.7.1. und II.7.3.).

7. CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN:

7.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde sowohl als analytisches Verfahren als auch für präparative Zwecke verwendet. Die dünn-schichtchromatographische Substanztrennung zu analytischen Bestimmungen wurde auf Kieselgel-DC-Folien sowie -Platten (Polygram Sil G/UV₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm; Macherey & Nagel, Düren) vorgenommen. Eine präparative Trennung wurde auf Kieselgel-DC-Platten (Polygram Sil G/UV₂₅₄, Schichtdicke 0,5 mm; Macherey & Nagel, Düren), aber auch auf DC-Folien (s.o., vergl. III.2.3.; III.3.3) durchgeführt.

Die verwendeten Laufmittel werden in Tabelle 6 wiedergegeben:

LM I	Ethylacetat-Methylethylketon-Ameisensäure-Wasser (5:3:1:1)
LM II	Benzol-Methanol (6:1)
LM III	n-Propanol-Ameisensäure-Wasser (90:1:9)
LM IV	Ethylacetat-Ameisensäure-Essigsäure(98%)-Wasser (100:11:11:27)
LM V	Chloroform-Methanol (70:17)
LM VI	Toluol-Chloroform-Aceton (40:25:35)

TABELLE 6: Zur analytischen und präparativen DC verwendete Laufmittel (LM)

Die Detektion erfolgte im UV Licht bei 254 und 366 nm. Zur Detektion von Phenolen wurde diazotierte Sulfanilsäure (GRIMMETT und REICHARDS, 1965) benutzt, sowie ein Bedampfen mit Ammoniak. DRAGENDORFF-Reagenz (JATZKEWITZ, 1953) und Kaliumjodplatinat (MUNIER, 1952) dienten zur Detektion Stickstoff haltiger Komponenten. Glycosidierte Verbindungen wurden durch Besprühen mit folgendem Reagenz (BAILEY und BOURNE, 1960) sichtbar:

Anilin (0,2g)
Diphenylamin (0,2g)
1 ml o-Phosphorsäure (85%)
ad 19 ml Aceton

Zur Nachbehandlung wurde die DC-Platte 10 min auf 85 °C erwärmt. Als Referenz diente Glucose.

7.2. Säulenchromatographie

Benutzte säulenchromatographische Methoden unterschieden sich in verwendeten Packungsmaterialien sowie Säulenvolumen. Sie dienten der Reinigung pflanzlicher Rohextrakte und Isolation rezeptorologisch detektierter Wirkkomponenten. Nachfolgend aufgeführte Füllmaterialien wurden eingesetzt:

- Amberlite XAD2 (0,30-1,00 mm; Serva, Heidelberg)
- Lichroprep RP8 (0,04-0,063 mm; Merck)
- Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm; Merck)
- MN Polyamid SC6 (0,05-0,16 mm; Macherey & Nagel, Düren)
- Sephadex LH20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Die Fraktionierungen erfolgten bei RT unter hydrostatischen Bedingungen. Ein Elutionsprofil wurde mit Hilfe eines Durchflußphotometers (280 nm) und Potentiometerschreibers erstellt. Bei einigen Fraktionierungen (Kieselgel- und Sephadex-Säulenchromatographie) erfolgte die Detektion bei 366 nm mit einer UV-Lampe oder bei 280 nm mit dem Photometer manuell.

7.3. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie wurde für analytische Messungen, aber auch präparativ eingesetzt.

Analytische Trennungen von Pflanzeninhaltsstoffen erfolgten auf einer Kontrosorb RP-18 5 gepackten Säule (5 x 250 mm; Kontron, Schweiz). Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 5 nach 95% Acetonitril in Wasser (0,1% o-Phosphorsäure) innerhalb von 20 min. Die Flußrate betrug 1 ml/min und das Injektionsvolumen 5-20 µl. Die Detektion erfolgte bei 345 nm (vergl. Abb. 22).

Semipräparative Auftrennungen von rezeptoraktiven Sekundärmetaboliten wurden auf einer Nucleosil 10 C-18 gepackten Säule (16 x 250 mm; Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt. Ein linearer Gradient von 5 nach 95% Acetonitril in Wasser (0,1% o-Phosphorsäure) wurde in 40 min erreicht. Ein Fluß von 5 ml/min wurde gewählt, die Detektion bei 345 nm (vergl. Abb. 22) vorgenommen. Injiziert wurden Probenvolumina von 1-2 ml.

8. SPEKTROSKOPISCHE METHODEN:

8.1. Massenspektroskopische Untersuchungen

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte unter EI-Bedingungen (Elektronenstoß-Ionisation) bei 70 eV. Darüberhinaus wurden hochauflösende Massenspektren auf einem Finnigen MAT Gerät aufgezeichnet.

8.2. Kernresonanzspektroskopie

Es wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren bei jeweils 360 und 90 MHz aufgenommen in CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$ und $\text{Aceton}-d_6$. Neben der eindimensionalen Methode wurde auch die zweidimensionale (2D-) NMR-Spektroskopie angewandt. Diese 2D-NMR-Spektren wurden als Konturdiagramme (Contour plot) dargestellt. Aus den Konturdiagrammen von Korrelationsspektren (COSY-Spektrum; COSY = correlated spectroscopy) können Koppelungspartner direkt (Verbindungslinien) entnommen werden. Doppelresonanz-Messungen waren zur Bestimmung von Koppelungskonstanten

erforderlich. Die Koppelung zwei verschiedener Kernsorten konnte mit Hilfe der zweidimensionalen heteronuclear korrelierten Spektroskopie (HETCOR = heteronuclear correlated spectroscopy) ermittelt werden.

Für die Aufnahme der Spektren und ihre Interpretation sei an dieser Stelle Herrn Dr.H. Schübel und Herrn Stadler herzlich gedankt.

III. ERGEBNISSE

1. OPIAT- UND BENZODIAZEPINREZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN BEI
METHANOLISCHEN EXTRAKTEN AUS KALLUSKULTUREN

1.1. Vergleichende Studie
der Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Aktivität
bei Extrakten aus Kallusgewebe

Von mehr als 500 Kallus-Zellkulturen wurden methanolische Extrakte (vergl. II.5.1.) bereitet und im Opiat- und Benzodiazepin-Rezeptorassay auf ihre mögliche Fähigkeit, den entsprechenden Radioliganden, [^3H]Naloxon bzw. [^3H]Flunitrazepam, zu verdrängen, untersucht (Tabelle 3 und 4). Tabelle 7 gibt einen Überblick über die einzelnen Ergebnisse dieser Studie und ermöglicht einen synoptischen Vergleich der in den beiden Rezeptorassays gemessenen Aktivitäten. Diese Gegenüberstellung hat sich bei der Auswahl untersuchter Objekte, wie im weiteren noch dargelegt werden wird (III.1.2.), als äußerst hilfreich erwiesen. Eine weitere brauchbare Übersicht über das Gesamtergebnis der Studie ist in Abb. 6 gegeben. Hier wurde jeweils die Anzahl getesteter Kalluskulturen in Beziehung zu ermittelten Verdrängungsraten gesetzt.

Bei 280 getesteten Kalli findet sich ein niedriger Prozentsatz der Inhibition spezifischer [^3H]Naloxon-Bindung (0-30%). In der Summe zeigen etwa 100 untersuchte Zellkulturen 30-60% Hemmung der Radioligand-Bindung. Die Anzahl der Spezies, welche bis 80% Inhibition zeigen, nimmt kontinuier-

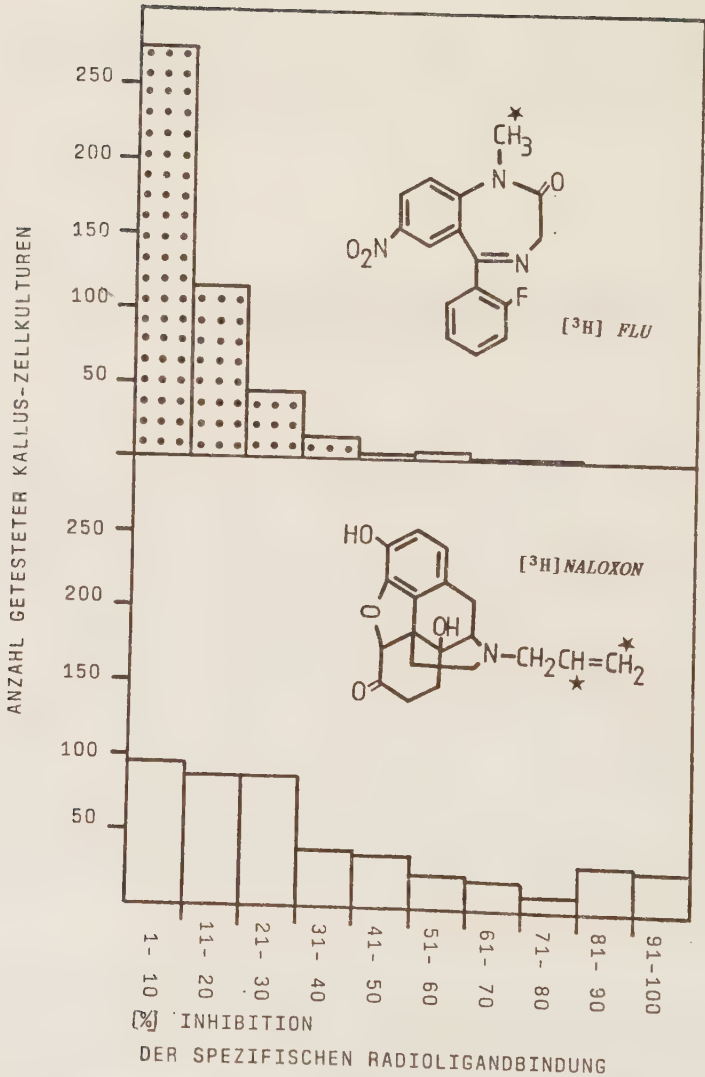


Abb. 6: Verdrängung von [³H]Naloxon im Opiatrezeptor-Bindungsassay und von [³H]Flunitrazepam im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay durch methanolische Extrakte aus Kallus-Zellkulturen. Zu den Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3 und Tabelle 4.

FAMILIE	SPEZIES	[³ H]-NALOXON	[³ H]-FLU
ACANTACEAE	<u>Catalpa bignoides</u>	27	10
AMARYLLIDACEAE	<u>Hippastrum spec.</u>	24	6
	<u>Amaryllis hyb.</u>	24	0
AMARANTHACEAE	<u>Beta vulgaris</u>	22	15
ANNONACEAE	<u>Annona cherimolia</u>	90	41
APIACEAE	<u>Anthetium graveolens</u>	5	17
	<u>Bupleurum ranunculoides</u>	15	9
	<u>Daucus carota</u>	0	0
	<u>Pimpinella saxifraga</u>	20	6
	<u>Trinia glauca</u>	0	6
APOCYNACEAE	<u>Alstonia scholaris</u>	4	10
	<u>Amsonia ciliata</u>	35	2
	<u>Amsonia salicifolia</u>	0	0
	<u>Amsonia tabernae montana</u>	2	7
	<u>Catharanthus longifolius</u>	1	7
	<u>Catharanthus ovalis</u>	20	7
	<u>Catharanthus pusillus</u>	29	2
	<u>Catharanthus roseus</u>	7	6
	<u>Catharanthus roseus</u>	66	36
	var. <u>alba</u>		
	<u>Catharanthus roseus</u>	1	0
	(Stamm: MT 55)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	8	0
	(Stamm: MT 55 Ri 18)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	8	0
	(Stamm: Pu 10)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	0	1
	(Stamm: Pu Pla)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	9	12
	(Stamm: Pu Stock)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	23	7
	(Stamm: SR 28)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	0	2
	(Stamm: SR 28 weiß)		
	<u>Catharanthus roseus</u>	0	5
	("Bright Eyes")		
	<u>Catharanthus roseus</u>	2	2
	("Little Bright Eye")		
	<u>Catharanthus roseus</u>	0	1
	("Little Blanche")		

	<u>Catharanthus roseus</u>	7	5
	("Purity")		
	<u>Catharanthus roseus</u>	20	1
	("Rose carpet")		
	<u>Catharanthus roseus</u>	31	11
	("Tapetalor")		
	<u>Catharanthus roseus</u>	11	9
	("Twinkles")		
	<u>Catharanthus trichophyllus</u>	0	0
	<u>Ervatamia divaricata</u>	66	4
	<u>Ervatamia divaricata</u>	21	2
	(Stamm: 647)		
	<u>Picralima nitida</u>	73	18
	<u>Rauwolfia chinensis</u>	12	0
	<u>Rauwolfia manii</u>	31	2
	<u>Rauwolfia serpentina</u>	66	2
	<u>Rauwolfia vanitoria</u>	32	1
	<u>Rauwolfia verticillata</u>	39	0
	<u>Stemadenia palmeri</u>	44	4
	<u>Vinca major</u>	14	25
	<u>Vinca herbaceae</u>	15	5
	<u>Voacanga africana</u>	10	7
ARALIACEAE	<u>Panax ginseng</u>	18	1
ARISTOLOCHACEAE	<u>Aristolochia elegans</u>	6	0
	<u>Aristolochia grandiflora</u>	8	0
ASCLEPIADACEAE	<u>Vincetoxicum fuscum</u>	9	0
ASTERACEAE	<u>Arnica montana</u>	20	0
	<u>Artemisia alba</u>	32	9
	<u>Artemisia dracunculus</u>	14	0
	<u>Artemisia mutellina</u>	21	12
	<u>Artemisia vallesiaca</u>	29	9
	<u>Carlina acaulis</u>	38	17
	<u>Carlina vulgaris</u>	26	13
	<u>Centaurea paniculata</u>	10	16
	<u>Chrysanthemum maritimum</u>	26	17
	<u>Chrysanthemum alpinum</u>	33	0
	<u>Echinacea purpurea</u>	27	14
	<u>Erigeron atticus</u>	34	14
	<u>Hieracium peletierianum</u>	21	19
	<u>Hieracium prenanthoides</u>	17	0
	<u>Hieracium staticifolium</u>	27	2
	<u>Lactuca sativa</u>	2	51
	<u>Leontodon helveticus</u>	15	19
	<u>Montanoa cavinskii</u>	15	6
	<u>Senecio carniolicus</u>	11	21
	<u>Senecio rupester</u>	34	0

BERBERIDACEAE

<u>Tragopogon dubis</u>	34	26
<u>Tussilago farfara</u>	12	14
<u>Berberis aggregata</u>	92	11
<u>Berberis aggregata recurva</u>	82	3
<u>Berberis amurensis</u>	61	1
<u>Berberis amurensis</u>	51	16
<u>Berberis arrido callida</u>	14	0
<u>Berberis angulosa</u>	85	8
<u>Berberis aristata</u>	65	32
<u>Berberis asiatica</u>	99	7
<u>Berberis atropurpurea</u>	84	0
<u>Berberis berii</u>	87	48
<u>Berberis bretschnideri</u>	76	21
<u>Berberis cana</u>	99	28
<u>Berberis candidula</u>	93	12
<u>Berberis carminea</u>	50	23
<u>Berberis cerasina</u>	99	14
<u>Berberis chinensis</u>		6
<u>Berberis concina</u>	67	54
<u>Berberis crataegina</u>	97	37
<u>Berberis cretica</u>	61	20
<u>Berberis dasystachia</u>	48	1
<u>Berberis diaphana</u>	85	16
<u>Berberis diaphana</u>	89	22
<u>Berberis dielsiana</u>	69	3
<u>Berberis edgeworthiana</u>	97	14
<u>Berberis fendleri</u>	82	16
<u>Berberis franchetiana</u>	91	22
<u>Berberis francisi fernandii</u>	59	0
<u>Berberis gagnepainii</u>	24	11
<u>Berberis gilgrana</u>	98	21
<u>Berberis gilgrana</u>	50	3
(Stamm: 52)		
<u>Berberis giraldii</u>	84	21
<u>Berberis hakodale</u>	56	13
<u>Berberis hamiltonia</u>	79	11
<u>Berberis hanniensis</u>	99	35
<u>Berberis henriana</u>	78	26
<u>Berberis heterocarpa</u>	58	9
<u>Berberis iliensis</u>	26	11
<u>Berberis jamesiana</u>	86	28
<u>Berberis julia</u>	49	10
<u>Berberis koetaneana</u>	94	0
<u>Berberis laxiflora</u>	92	37
<u>Berberis lucida</u>	90	27
<u>Berberis lycioides</u>	91	20
<u>Berberis lycium</u>	98	22
<u>Berberis marcantha</u>	96	25
<u>Berberis murcifolia</u>	87	11

	<u>Berberis notabilis</u>	90	17
	<u>Berberis nummularia</u>	87	26
	<u>Berberis oltawensis</u>	96	20
	<u>Berberis orientale</u>	56	15
	<u>Berberis papillifera</u>	25	5
	<u>Berberis paravirescens</u>	81	4
	<u>Berberis parisejala</u>	92	32
	<u>Berberis parvifolia</u>	97	36
	<u>Berberis polycentha</u>	45	16
	<u>Berberis provincialis</u>	88	10
	<u>Berberis regeliana</u>	89	13
	<u>Berberis sibirica</u>	78	11
	<u>Berberis sieboldii</u>	15	19
	(Stamm: 71)		
	<u>Berberis sieboldii</u>	67	14
	(Stamm: 407)		
	<u>Berberis soulienana</u>		14
	<u>Berberis stenophylla</u>	89	5
	<u>Berberis stolonifera</u>	92	66
	(Stamm: V29)		
	<u>Berberis stolonifera</u>	87	25
	(Stamm: V30)		
	<u>Berberis taliensis</u>	93	51
	<u>Berberis thunbergii</u> var.		13
	<u>argentomarginata</u>		
	<u>Berberis turcomanica</u>	87	29
	<u>Berberis umbellata</u>	85	14
	<u>Berberis verruculosa</u>	23	0
	<u>Berberis vulgaris</u>	78	4
	<u>Berberis vulgaris</u>		3
	(Stamm: 57)		
	<u>Berberis vulgaris</u> var.	21	0
	<u>atropurpurea</u>		
	<u>Berberis wilsonae</u>	85	5
	<u>Berberis yunnanensis</u>		3
	<u>Naudina domestica</u>	59	16
	<u>Podophyllum emodi</u>	86	50
	(Stamm: 262)		
	<u>Podophyllum emodi</u>	98	57
	(Stamm: V38)		
	<u>Podophyllum hexandrum</u>		28
	(Stamm: 648)		
	<u>Podophyllum hexandrum</u>	91	33
	(Stamm: 265)		
	<u>Podophyllum peltatum</u>	97	37
	<u>Podophyllum peltatum</u>	55	0
	(Stamm: 267)		
BORAGINACEAE	<u>Lithospermum arvense</u>	10	19
BRASSICACEAE	<u>Alyssum argentum</u>	24	14
	<u>Armoracia rusticana</u>	15	12

	<u>Cheiranthus cheiri</u>	10	0
	<u>Erucastrum nasturtiifolium</u>	24	7
CAESALPINIACEAE	<u>Cassia angustifolia</u>	48	15
CAMPANULACEAE	<u>Campanula thyrsoidea</u>	14	16
	<u>Campanula cenisia</u>	28	9
	<u>Campanula latifolia</u>	24	10
	<u>Jasione alpestris</u>	20	53
	<u>Lobelia inflata</u>		7
CAPRIFOLIACEAE	<u>Lonicera alpigena</u>	39	21
	<u>Lonicera karolkowi</u>	11	0
	<u>Lonicera minutiflora</u>	14	0
	<u>Lonicera morrowii</u>	6	6
	<u>Lonicera tatarica</u>	14	5
	<u>Symphoricarpos orbiculatus</u>	16	0
	<u>Weigela florida</u>	25	2
	<u>Weigela gigantiflora</u>	10	0
	<u>Weigela japonica</u>	17	0
	<u>Weigela japonica</u>	3	3
	(Stamm: "Wejap")		
	<u>Weigela middendorffiana</u>	21	7
CARICACEAE	<u>Carica longifolia</u>	8	0
	<u>Carica papaya</u>	8	19
CARYOPHYLLACEAE	<u>Agrostemma githago</u>	28	6
	<u>Arenaria biflora</u>	22	10
	<u>Arenaria ciliata</u>	21	0
	<u>Cerastium latifolium</u>	32	7
	<u>Dianthus carthusianorum</u>	38	13
	<u>Dianthus deltoides</u>	21	0
	<u>Dianthus superbus</u>	35	0
	<u>Dianthus sylvestris</u>	21	12
	<u>Herniaria alpina</u>	30	15
	<u>Lychnis flos-cuculi</u>	23	2
	<u>Saponaria ocymoides</u>	22	17
	<u>Silene exscapa</u>	26	7
	<u>Silene prostrata</u>	29	13
	<u>Scleranthus perennis</u>	14	7
CELASTRACEAE	<u>Maytenus serrata</u>	12	3
DIOSCOREACEAE	<u>Dioscorea composita</u>	13	0
DROSERACEAE	<u>Drosera burkleana</u>	5	6
	<u>Drosera capillaris</u>	9	7
	<u>Drosera intermedia</u>	8	5
	<u>Drosophyllum lusitanicum</u>	0	4

EMPETRACEAE	<u>Empetrum hermaphroditum</u>	12	10
ERICACEAE	<u>Loiseleuria procumbens</u>	33	2
	<u>Vaccinium vitis-idaea</u>	12	0
EUCOMIACEAE	<u>Eucomia ulmoides</u>	25	10
EUPHORBIACEAE	<u>Euphorbia cyparissias</u>	7	5
FABACEAE	<u>Astragalus preussii</u>	17	0
	<u>Glycine max</u>	27	10
	<u>Glycine max</u> (Stamm: "Gieso")	15	39
	<u>Lupinus albus</u>	50	19
	<u>Lupinus hartwegii</u>	46	1
	<u>Lupinus luteus</u>	22	0
	<u>Lupinus mutabilis</u>	23	0
	<u>Medicago sativa</u>	3	0
	<u>Melilotus alba</u>	8	9
	<u>Onobrychis montana</u>	27	1
	<u>Onobrychis viciifolia</u>	29	4
	<u>Phaseolus radiatus</u>	24	71
	<u>Trifolium rubens</u>	32	6
	<u>Vicia tetrasperma</u>	18	0
FAGACEAE	<u>Quercus robur</u>	0	14
FUMARIACEAE	<u>Corydalis cava</u>	42	0
	<u>Corydalis glauca</u>	36	0
	<u>Corydalis glauca</u> (Stamm: 693)	6	0
	<u>Corydalis heterocarpa</u>	79	0
	<u>Corydalis ochroleuca</u>	7	22
	<u>Corydalis ophiocarpa</u>	50	1
	<u>Corydalis ophiocarpa</u> (Stamm: 197)	4	8
	<u>Corydalis ophiocarpa</u> (Stamm: 198)	8	0
	<u>Corydalis ophiocarpa</u> (Stamm: 199)	10	4
	<u>Corydalis pallida</u>	11	0
	<u>Corydalis saxicola</u>	45	18
	<u>Corydalis sempervirens</u> (Stamm: 200)	0	4
	<u>Corydalis sempervirens</u> (Stamm: 202)	5	6
	<u>Corydalis vaginans</u> (Stamm: 360)	58	0
	<u>Corydalis vaginans</u> (Stamm: 574)	9	0

	<u>Dicentra spectabilis</u>	46	9
	<u>Fumaria capreolata</u>	46	13
	<u>Fumaria muralis</u>	6	3
	<u>Fumaria officinalis</u>	0	0
	<u>Fumaria officinalis</u> (Stamm: "Fumo")	17	10
	<u>Fumaria parviflora</u>	9	13
GENTIANACEAE	<u>Gentiana bavarica</u>	42	16
	<u>Gentiana lutea</u>	15	6
	<u>Gentiana septemfida</u>	3	4
	<u>Gentiana verna</u>	20	2
GESNERIACEAE	<u>Streptocarpus dunii</u>	21	13
IRIDACEAE	<u>Iris pallida</u>	27	9
LAMIACEAE	<u>Coleus blumei</u>	19	12
	<u>Coleus carnosus</u>	18	8
	<u>Coleus farskollii</u>	38	17
	<u>Coleus hybridus</u>	26	3
	<u>Coleus shirensis</u>	28	6
	<u>Melittis melissophyllum</u>	29	9
	<u>Ocimum basilicum</u>	10	0
	<u>Rosmarinus officinalis</u>	8	0
	<u>Teucrium botrys</u>	12	7
	<u>Teucrium chamaedrys</u>	29	26
	<u>Satureja hortensis</u>	28	24
LILIACEAE	<u>Allium cepa</u>	4	0
	<u>Muscari amurensis</u>	6	3
	<u>Gloriosa rothschildiana</u>	19	0
	<u>Gloriosa superba</u>	22	2
LINACEAE	<u>Linum tenuifolium</u>	13	2
	<u>Linum usitatissimum</u>		4
LOGANIACEAE	<u>Gelsenium sempervirens</u>	0	13
LYTHRACEAE	<u>Lythrum salicaria</u>	19	23
MALVACEAE	<u>Gossypium herbaceum</u>		20
	<u>Malva neglecta</u>	32	13
MELIACEAE	<u>Azadirachta indica</u>	20	14
MENISPERMACEAE	<u>Chondodendron digrapha</u>	21	30
	<u>Chondodendron tomentosa</u>	7	31

	<u>Cissampelos andromorpha</u>	27	
	<u>Cissampelos mucronata</u>	13	15
	<u>Cocculus carolinus</u>	2	4
	<u>Cocculus trilobus</u>	79	73
	<u>Menispermum canadense</u>	65	27
	<u>Sanguinaria canadensis</u>	39	23
	<u>Stephania delavayi</u>	50	26
	<u>Stephania japonica</u>	63	16
	<u>Stephania pierrei</u>	85	70
	<u>Tinospora caffra</u>	9	4
	<u>Tinospora cordifolia</u>	5	0
	<u>Tinospora fragosa</u>	60	12
	<u>Tinospora tenera</u>	34	27
	<u>Tinospora cordifolia</u>	3	0
MONIMIACEAE	<u>Pneumus boldus</u>	96	29
MORACEAE	<u>Ficus carica</u>	10	7
OLEACEAE	<u>Ligustrum vulgare</u>	0	0
	var. <u>glaucum</u>		
	<u>Syringa vulgaris</u>	0	5
ONAGRACEAE	<u>Oenothera biennis</u>		35
PAPAVERACEAE	<u>Adlumia fungosa</u>	42	10
	<u>Adlumia fungosa</u>	53	7
	(Stamm: 271)		
	<u>Argemone alba</u>	48	22
	<u>Argemone grandiflora</u>	49	26
	(Stamm: 272)		
	<u>Argemone intermedia</u>	39	36
	<u>Argemone mexicana</u>	47	6
	<u>Argemone mexicana</u>	46	14
	(Stamm: 278)		
	<u>Argemone ochroleuca</u>	82	56
	(Stamm. 561)		
	<u>Argemone ochroleuca</u>	51	11
	(Stamm: 689)		
	<u>Argemone platyceras</u>	29	0
	<u>Argemone platyceras</u>	47	2
	(Stamm: 564)		
	<u>Argemone polyanthemos</u>	65	15
	<u>Bocconia cordata</u>	70	13
	<u>Bocconia cordata</u>	82	20
	var. <u>vedoensis</u>		
	<u>Chelidonium franchetiatum</u>	22	9
	<u>Chelidonium majus</u>	6	36
	(Stamm: 12)		
	<u>Chelidonium majus</u>	39	16
	var. <u>lacinatum</u>		

<u>Cysticapnos vesicarius</u>	7	9
(Stamm: 566)		
<u>Cysticapnos vesicarius</u>	31	5
(Stamm: 567)		
<u>Eschscholtzia californica</u>	46	13
<u>Eschscholtzia californica</u>	39	16
(Stamm: 36/1047)		
<u>Eschscholtzia californica</u>	83	32
(Stamm: 37/1076)		
<u>Eschscholtzia californica</u>	85	22
(Stamm: 38/1077)		
<u>Eschscholtzia californica</u>	24	13
(Stamm: ECO R)		
<u>Eschscholtzia californica</u>	84	43
(Stamm: ECO 1088)		
<u>Eschscholtzia californica</u>	80	36
(Stamm: ECO Th. 3051)		
<u>Eschscholtzia ciliata</u> 1724		5
(Stamm: 1724)		
<u>Eschscholtzia coespitosa</u> 489	16	11
(Stamm: 489)		
<u>Eschscholtzia douglasii</u>	65	13
<u>Eschscholtzia douglasii</u>	91	33
(Stamm: "Edoug.FHB")		
<u>Eschscholtzia douglasii</u>	44	27
(Stamm: "Edoug.F.V.")		
<u>Eschscholtzia glauca</u>	42	9
(Stamm: 62)		
<u>Eschscholtzia lobbii</u>	0	7
<u>Eschscholtzia marginata</u>	18	0
<u>Eschscholtzia pulchella</u>	20	5
<u>Eschscholtzia stenocraspedontae</u>	65	5
<u>Eschscholtzia tenuifolia</u>	55	12
<u>Eschscholtzia tenuifolia</u>	56	7
(Stamm: "Eten W")		
<u>Glaucium corniculatum</u>	94	42
(Stamm: 48)		
<u>Glaucium corniculatum</u>	92	13
(Stamm: 101)		
<u>Glaucium corniculatum</u>	63	9
(Stamm: 299)		
<u>Glaucium corniculatum</u>	95	15
(Stamm: 300)		
<u>Glaucium corniculatum</u>	93	17
(Stamm: 301)		
<u>Glaucium elegans</u>	97	30
<u>Glaucium flavum</u>	60	17
<u>Glaucium rubrum</u>	65	15
<u>Glaucium vitellinum</u>	11	3
<u>Macleaya cordata</u>	40	4

<u>Macleana microcarpa</u>	52	5
<u>Meconopsis cambrica</u>	18	3
<u>Papaver aculeatum</u>	16	8
<u>Papaver alpinum</u>	37	19
var. <u>sendtaene</u>		
<u>Papaver argemone</u>	53	23
<u>Papaver bracteatum</u>	19	6
<u>Papaver fugax</u>		7
<u>Papaver heldreichii</u>	18	2
<u>Papaver kernerie</u>	22	12
<u>Papaver kewense</u>	24	0
<u>Papaver nordhagianum</u>	49	22
<u>Papaver orientale</u>	15	5
<u>Papaver orientale</u>	11	8
(Stamm: 28)		
<u>Papaver orientale</u>	13	
(Stamm: 164)		
<u>Papaver schinjianum</u>	52	17
(Stamm: 391)		
<u>Papaver schizianum</u>	64	3
<u>Papaver somniferum</u>	62	2
(Stamm: 049)		
<u>Papaver somniferum</u>	10	
(Stamm: 101)		
<u>Papaver somniferum</u>	29	
(Stamm: 12)		
<u>Papaver somniferum</u>	29	
(Stamm: 75)		
<u>Papaver somniferum</u>	35	
(Stamm: SI rot)		
<u>Papaver somniferum</u>	29	0
("Paso 47")		
<u>Papaver somniferum</u>	21	5
(Stamm: Afghanistan)		
<u>Papaver somniferum</u>	0	5
(Stamm: Budapest)		
<u>Papaver somniferum</u>	65	28
(Stamm: Paris)		
<u>Papaver somniferum</u>	39	10
var. <u>albus</u>		
<u>Papaver somniferum</u>		9
var. <u>albescens</u>		
<u>Papaver somniferum</u>	47	0
var. <u>nigrum serenum</u>		
<u>Papaver somniferum</u>	51	
var. <u>nigrum spilanthum</u>		
<u>Papaver somniferum</u>	39	9
var. <u>rhodanthum</u>		
<u>Papaver somniferum</u>	51	10
var. <u>rubidum</u>		

	<u>Papaver somniferum</u>	46	6
	<u>var. rotundilobum glaucescens</u>		
	<u>Papaver somniferum</u>	38	7
	<u>var. rotundilobum linens</u>		
	<u>Papaver somniferum</u>		1
	<u>var. rotundilobum sigillatum</u>		
	<u>Papaver somniferum</u>		6
	<u>var. sanguineum</u>		
	<u>Papaver strictum</u>	50	12
	<u>Roemeria rhocadiflora</u>	21	2
	<u>Roemeria rofeacta</u>	27	2
PINACEAE	<u>Abies grandis</u>	28	1
	<u>Pinus helepensis</u>	0	8
	<u>Pinus pinea</u>	0	5
	<u>Picea abies</u>	45	32
PLATAGINACEAE	<u>Plantago alpina</u>	35	13
POACEAE	<u>Agrostis tenuis</u>	15	13
	<u>Avena sativa</u>	19	12
	(Stamm: "Flämingsregent")		
	<u>Secale cereale</u>	13	6
	(Stamm: "Halo")		
	<u>Secale cereale</u>	21	0
	(Stamm: "Sorom")		
	<u>Triticum aestivum</u>	12	8
	<u>Zea mays</u>	27	9
	(Stamm: "Forla")		
	<u>Zea mays</u>	7	10
	(Stamm: "Hit")		
	<u>Zea mays</u>	22	20
	(Stamm: "Mutin")		
	<u>Zea mays</u>	29	13
	(Stamm: "Pinto")		
	<u>Zea mays</u>	23	11
	(Stamm: "Santos")		
POLYGONACEAE	<u>Polygonum tinctorum</u>	13	7
	<u>Rheum franchetiana</u>	1	12
	<u>Rheum officinale</u>	13	1
	(Stamm: "Realta")		
	<u>Rheum officinale</u>	2	2
	(Stamm: "Reo alt")		
	<u>Rheum officinale</u>	7	13
	(Stamm: "Reo 71")		
	<u>Rheum officinale</u>	12	3
	(Stamm: "Reo 78")		
	<u>Rheum palmatum</u>	10	7
	(Stamm: "Repa 81")		
	<u>Rheum rhaponticum</u>	0	5
	<u>Rumex alpester</u>	21	22

PRIMULACEAE	<u>Androsace alpina</u>	26	11
	<u>Douglasia vitaliana</u>	18	8
RANUNCULACEAE	<u>Aquilegia chrysantha</u>	18	0
	<u>Aquilegia chrysantha</u> (Stamm: 422)	10	
	<u>Aquilegia skinneri</u>	21	0
	<u>Ranunculus parviflorus</u>	9	0
	<u>Thalictrum alpinum</u>	17	8
	<u>Thalictrum anemonoides</u>	71	8
	<u>Thalictrum aquilegifolium</u>	33	0
	var. <u>atropupurea</u>		
	<u>Thalictrum baicalense</u>	71	23
	<u>Thalictrum bulgaricum</u>	56	13
	<u>Thalictrum calabricum</u>	19	11
	<u>Thalictrum coerulum</u>	30	2
	<u>Thalictrum collinum</u>	65	18
	<u>Thalictrum contrortum</u>	18	10
	<u>Thalictrum coreanum</u>	11	15
	<u>Thalictrum dasycarpum</u>	52	12
	<u>Thalictrum delavayi</u>		21
	<u>Thalictrum dioicum</u>	59	18
	<u>Thalictrum dipterocarpum</u>	43	8
	<u>Thalictrum exaltatum</u>	40	0
	<u>Thalictrum flavum</u>	13	6
	<u>Thalictrum foetidum</u>	42	18
	<u>Thalictrum fortunei</u>	31	9
	<u>Thalictrum galioides</u>	13	0
	<u>Thalictrum glabrum</u>	56	23
	<u>Thalictrum kewense</u>	24	0
	<u>Thalictrum minus</u>		10
	var. <u>pubescens</u>		
	<u>Thalictrum minus</u>	20	0
	var. <u>adiantifolia</u>		
	<u>Thalictrum morisonii</u>	26	5
	<u>Thalictrum rhynchocarpum</u>	61	16
	<u>Thalictrum specioissimum</u>	2	7
	<u>Thalictrum squarrosum</u>	7	0
	<u>Thalictrum thunbergii</u>	14	5
	<u>Thalictrum tuberosum</u>	26	5
ROSACEAE	<u>Agrimonia eupatoria</u>	9	18
	<u>Geum montanum</u>	27	2
	<u>Malus spec.</u> ("Cox orange")	30	4
	<u>Malus spec.</u> ("Klarapfel Nr.17")	22	0
	<u>Malus spec.</u> ("Klarapfel weiß")	18	12

	<u>Rosa canina</u>	13	11
	<u>Rosa rubifolia</u>	21	20
	<u>Rubus saxatilis</u>	37	26
RUBIACEAE	<u>Asperula glabra</u>	18	5
	<u>Galium mollugo</u>	3	0
	<u>Galium pumilum</u>	26	15
	<u>Galium sternerie</u>	27	7
	<u>Guettarda eximia</u>	0	6
	<u>Mitragyne speciosa</u>	13	14
	<u>Morinda citrifolia</u>	16	10
	<u>Morinda citrifolia</u>	0	14
	(Stamm: 80)		
	<u>Nauclea latifolia</u>	0	0
	<u>Rubia tinctorum</u>	21	5
RUTACEAE	<u>Citrus decumana</u>	6	2
	(Stamm: "White Marsh")		
	<u>Citrus limon</u>	40	12
	(Stamm: "Ponderosa limon")		
	<u>Citrus sinensis</u>	25	0
	(Stamm: "Sunshine orange")		
	<u>Ruta graveolens</u>	7	25
	<u>Ruta montana</u>	9	10
	<u>Ruta calepensis</u>	14	13
SALIACEAE	<u>Salix retusa</u>	24	2
SAXIFRAGACEAE	<u>Saxifraga androsacea</u>	42	13
SCROPHULARIACEAE	<u>Digitalis lanata</u>	16	4
	<u>Digitalis purpurea</u>	24	4
SOLANACEAE	<u>Capsicum placenta</u>	17	5
	<u>Datura meteloides</u>	17	3
	<u>Datura stramonium</u>	42	9
	<u>Duboisia myopuroides</u>	14	16
	<u>Duboisia myopuroides</u>	30	1
	(Stamm: 32)		
	<u>Nicotiana glauca</u>	15	7
	<u>Nicotiana rustica</u>	9	9
	<u>Nicotiana solanifolia</u>	22	7
	<u>Nicotiana sylvestris</u>	25	14
	<u>Nicotiana tabacum</u>	0	9
	(Stamm: Brüssel)		
	<u>Nicotiana tabacum</u>	20	0
	<u>Nicotiana tabacum</u>	15	0
	(Stamm: NT 24-356)		
	<u>Nicotiana tabacum</u>	2	2
	(Stamm: NT 34-356 KO)		

	<u>Nicotiana tabacum</u>	13	0
	(Stamm: NT 601-1)		
	<u>Nicotiana tabacum</u>	7	5
	(Stamm: NT 601-1 KO)		
	<u>Nicotiana tabacum</u>	4	1
	var. <u>xanthii</u>		
	<u>Petunia hybrida</u>	2	0
	<u>Solanum lycopersicum</u>	0	3
	<u>Solanum melongena</u>	32	9
	<u>Solanum tuberosum</u>	16	11
VERBENACEAE	<u>Verbena hispida</u>	5	6
	<u>Verbena pulchella</u>	48	8

TABELLE 7: Vergleichende Übersicht: Inhibition [%] der spezifischen Radioligand-Bindung in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay (vergl. Tabellen 3 und 4) durch methanolische Extrakte (II.5.1.) aus Kalluszellkulturen (Dreifachbestimmungen). Die fettgedruckten Werte stellen jeweils die maximal erreichte Inhibition innerhalb einer Pflanzenfamilie in den beiden Rezeptor-Bindungsstudien dar.

lich ab. Die leichte Zunahme der Artenzahl, die einen hohen Prozentsatz der Rezeptor-Aktivität aufweisen, kann auf eine starke Inhibitionsrate bei einigen wenigen Pflanzenfamilien, z.B. der Berberidaceae (vergl. Tabelle 7) zurückgeführt werden. Demgegenüber beobachtet man im Benzodiazepinrezeptor-Assay eine erhebliche Verschiebung der Rezeptoraktivität untersuchter Kalli zu niedrigen Verdrängungsraten. Nahezu 275 untersuchte Zellkulturen- also etwa die Hälfte aller untersuchten Objekte- zeigen nur 0-10% Hemmung der spezifischen [³H]FLU-Bindung, etwas mehr als 100 getestete Arten 10 - 20% und weniger als 50 Spezies 20-30% Inhibition der Radioligand-Bindung. Höchste Verdrängungsraten (80-100% Inhibition) wie im Opiatrezeptor-Bindungsassay konnten beim Benzodiazepinrezeptor durch Zugabe methanolischer Extrakte aus Kalluskulturen nicht erreicht werden. Nur wenige Vertreter mit einer Aktivität um 70% wurden gefunden. Das seltene

Vorkommen hoher [^3H]FLU- Verdrängungsraten erleichterte wesentlich die Auswahl interessanter Zellkulturen in Hinblick auf die Aufklärung des Benzodiazepinrezeptor aktiven Prinzips. Jedoch waren auch hier wie für die Auswahl Opiatrezeptor aktiver Kalluskulturen weitere Entscheidungshilfen erforderlich (vergl. III.1.2.). Die einzelnen Kalluskulturen konnten 57 verschiedenen Pflanzenfamilien zugeordnet werden (vergl. Tabelle 8). Von den meisten dieser Familien wurden nur ein oder wenige Vertreter im Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay untersucht. Bei einigen anderen Familien wurden wesentlich mehr Arten im Rezeptorassay getestet, z.B. bei Apocynaceen 20 Kalluskulturen, bei Menispermaceen 16 Vertreter und bei den Ranunculaceen mehr als 30. Führend in der Anzahl untersuchter Kalli blieben jedoch die Berberidaceen und Papaveraceen mit jeweils mehr als 75 Zellkulturen.

Bei solchen Familien, bei denen nur wenige Arten auf eine Rezeptoraktivität überprüft wurden, kann aus den aufgeführten Werten keine allgemeine Aussage über das Rezeptorverhalten anderer Vertreter dieser Familie abgeleitet werden. Aussagekräftiger sind die Ergebnisse bei solchen Familien, von denen etwa 20 Gewebekulturen untersucht wurden (vergl. Tabelle 8).

Bei den Apocynaceae konnte für die Verdrängung von [^3H]Naloxon ein Mittelwert von 20% berechnet werden, der niedrigste Wert betrug bei dieser Familie 0%, der höchste 73%. Im Benzodiazepinrezeptor-Assay wurde hier nur ein Mittelwert von 10% erreicht, eine maximale Verdrängung von 36% zeigte sich bei C. roseus var. alba.

Anders sind die Verhältnisse bei den untersuchten Berberidaceae. Hier konnte für die Bindung des Radioliganden am

FAMILIE	[³ H]-NALOXON	[³ H]-FLU	ARTEN
ACANTACEAE	27	10	1
AMARYLLIDACEAE	24	3	2
AMARANTHACEAE	22	15	1
ANNONACEAE	90	41	1
APIACEAE	8	8	5
APOCYNACEAE	20	10	20
ARALIACEAE	18	1	1
ARISTOLOCHIACEAE	7	0	2
ASCLEPIADACEAE	9	0	1
ASTERACEAE	23	13	22
BERBERIDACEAE	76	18	76 (82)
BORAGINACEAE	10	19	1
BRASSICACEAE	18	8	4
CAESALPINIACEAE	48	15	1
CAMPANULACEAE	22	19	4 (5)
CAPRIFOLIACEAE	16	4	11
CARICACEAE	8	9	2
CARYOPHYLLACEAE	26	8	14
CELASTRACEAE	12	3	1
DIOSCOREACEAE	13	0	1
DROSEARCEAE	6	6	4
EMPETRACEAE	12	10	1
ERICACEAE	23	1	2
EUCOMIACEAE	25	10	1
EUPHORBIACEAE	7	5	1
FABACEAE	24	11	14
FAGACEAE	0	14	1
FUMARIACEAE	23	5	21
GENTIANACEAE	20	7	4
GESNERIACEAE	21	13	1
IRIDACEAE	27	9	1
LAMIACEAE	22	10	11
LILIACEAE	13	1	4
LINACEAE	18	3	1 (2)
LOGANIACEAE	0	13	1
LYTHRACEAE	19	23	1

FAMILIE	[³ H]-NALOXON	[³ H]-FLU	ARTEN
MALVACEAE	32	17	1 (2)
MELIACEAE	20	14	1
MENISPERMACEAE	35	24	16 (15)
MONIMIACEAE	96	29	1
MORACEAE	10	7	1
OLEACEAE	0	3	2
ONAGRACEAE	0	35	1
PAPAVERACEAE	44	13	81 (80)
PINACEAE	18	12	4
PLATAGINACEAE	35	13	1
POACEAE	19	10	10
POLYGONACEAE	9	8	9
PRIMULACEAE	22	10	2
RANUNCULACEAE	32	8	31 (32)
ROSACEAE	22	12	8
RUTACEAE	17	10	6
SALIACEAE	24	2	1
SAXIFRAGACEAE	42	13	1
SCROPHULARIACEAE	20	4	2
SOLANACEAE	15	6	20
VERBENACEAE	27	7	2

TABELLE 8: Übersicht untersuchter Pflanzenfamilien in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay: Methanolische Extrakte aus Kalluszellkulturen (Dreifachbestimmungen) wurden zur Ermittlung der Inhibition [%] der spezifischen Radioligand-Bindung in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay verwendet (Inkubationsbedingungen vergl. Tabellen 3 und 4). Eingetragen sind jeweils die Anzahl getesteter Arten, wobei die in Klammern aufgeführten Werte sich auf die im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay ermittelten Werte beziehen bei gegebener Abweichung der Artenanzahl in den beiden Rezeptorbindungsstudien.

Opiatrezeptor eine durchschnittliche Inhibition von 76% ermittelt werden. Der Minimalwert von nur 14% Hemmung kann hier als eine Ausnahme betrachtet werden. Bis zu 99% Verdrängung des Radioliganden wurden erreicht. Auch der

Mittelwert für die [^3H]FLU-Verdrängung liegt mit 18% relativ hoch. Bei Berberis stolonifera (Stamm: V29) wurde eine Inhibition von 66% gemessen, es gab jedoch auch Kulturen aus der Familie der Berberidaceae die keine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität zeigten. Das Beispiel der Berberidaceae macht deutlich, wie unterschiedlich nicht nur innerhalb einer Familie die prozentuale Verdrängung in vorliegenden Rezeptorstudien ist, sondern auch die Geni und verschiedenen Stämme einer Spezies recht auffällige Unterschiede in der vorliegenden Studie aufweisen.

Bei den Papaveraceen, der Familie mit der umfangreichsten Anzahl untersuchter Arten, liegt der durchschnittliche Wert für die Hemmung der spezifischen [^3H]Naloxon-Bindung mit 44% relativ hoch (Tabelle 8). Ähnlich wie bei der Familie der Apocynaceae findet man bei den Papaveraceen Werte maximaler Verdrängung; methanolische Auszüge von Glaucium elegans hemmen die Radioligand-Bindung im Opiatrezeptortest zu 97%. Gleichzeitig findet man aber auch Spezies, welche keine Verdrängung des markierten Liganden aufweisen, z.B. bei Eschscholtzia lobbii und P. somniferum (Stamm: Budapest). Die durchschnittliche Inhibition der [^3H]FLU-Bindung am Rezeptor beträgt hier nur 13%; maximal erreicht wurde bei einem Stamm von Argemone ochroleuca (Stamm: 561) eine Inhibition von 56%, ein Wert, der sich in der Höhe von den übrigen bei den Papaveraceae ermittelten Werten signifikant abhebt.

Diese wenigen besonders genannten Beispiele legen bereits einen Teilaspekt der Problematik bei der Auswahl geeigneter Zellkulturen für eine Wirkstoff-Detektion und -Isolation dar. Ähnliches gilt für alle übrigen Familien, für deren genauere Analyse ermittelter Daten die Tabellen 7 und 8 zur Verfügung stehen.

1.2. Auswahl pflanzlicher Zellkulturen mit hoher Rezeptoraktivität zur Isolation, Reinigung und Charakterisierung des aktiven Prinzips

Das Augenmerk richtete sich bei der Auswahl interessanter Zellkulturen zunächst auf die in den beiden Bindungsstudien jeweils erreichten Maximalwerte der Radioligand-Verdrängung.

Die Werte der [^3H]FLU-Verdrängung waren nur bei wenigen Kalluskulturen signifikant hoch, wie bereits in III.1.1. erwähnt. Sie wurden tabellarisch den Verdrängungsraten für [^3H]Naloxon gegenübergestellt (Tabelle 9). Bei dieser Auswahl findet man wiederum bei nur wenigen Vertretern eine auffallend erhöhte prozentuale Inhibition der [^3H]FLU-Bindung, z.B. bei den Menispermaceen Cocculus trilobus und Stephania pierrei eine Inhibition von jeweils 73 und 70%. Die Synopsis (Tabelle 9) ermöglicht einen Vergleich erreichter Verdrängungsraten der jeweiligen Zellkultur in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsstudie. Während bei Berberis stolonifera (Stamm: V29) die prozentuale Inhibition nicht nur im Benzodiazepinrezeptor-Assay mit 66% hoch ist, sondern auch im Opiatrezeptor-Assay (92%), findet man wenige Arten, die die [^3H]FLU-Bindung relativ stark inhibieren, aber die [^3H]Naloxon-Bindung kaum signifikant beeinträchtigen. Beispiele hierzu sind die Werte für Latuca sativa, Jasione alpester, Glycine max (Stamm: Gieso) und Phaseolus radiatus mit jeweils 51, 53, 39 und 71% Inhibition der [^3H]FLU-Bindung. Meist ist dieses Verhältnis umgekehrt. Besonders interessant bei diesen letzten Beispielen ist auch, daß diese Kalluskulturen aus recht unterschiedlichen Familien stammen, also dieses Phänomen nicht ausschließlich einer ganz speziellen Pflanzenfamilie zugeordnet werden kann. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Zellkulturen, deren Aktivität im Benzodiazepinrezeptor-Assay besonders auffiel.

FAMILIE	SPEZIES	[³ H]-NALOXON	[³ H]-FLU
ANNONACEAE	<u>Annona cherimolia</u>	90	41
APOCYNACEAE	<u>Picralima nitida</u>	73	18
ASTERACEAE	<u>Lactuca sativa</u>	2	51
BERBERIDACEAE	<u>Berberis berii</u>	87	48
	<u>Berberis concina</u>	67	54
	<u>Berberis stolonifera</u>	92	66
	(Stamm: V29)		
	<u>Berberis taliensis</u>	93	51
	<u>Podophyllum emodi</u>	86	50
	(Stamm: 262)		
	<u>Podophyllum emodi</u>	98	57
	(Stamm: V38)		
	<u>Podophyllum hexandrum</u>	91	33
	(Stamm: 265)		
	<u>Podophyllum peltatum</u>	97	37
CAMPANULACEAE	<u>Jasione alpester</u>	20	53
FABACEAE	<u>Glycine max</u>	15	39
	(Stamm: "Gieso")		
	<u>Phaseolus radiatus</u>	24	71
FUMARIACEAE	<u>Corydalis heterocarpa</u>	79	0
MENISPERMACEAE	<u>Cocculus trilobus</u>	79	73
	<u>Stephania pierrei</u>	85	70
MONIMIACEAE	<u>Pneumus boldus</u>	96	29
PAPAVERACEAE	<u>Argemone ochroleuca</u>	82	56
	(Stamm: 561)		
	<u>Bocconia cordata</u>	70	13
	<u>Bocconia cordata</u>	82	20
	var. <u>yedoensis</u>		
	<u>Eschscholtzia californica</u>	83	32
	(Stamm: 37/1076)		
	<u>Eschscholtzia californica</u>	85	22
	(Stamm: 38/1077)		
	<u>Eschscholtzia douglasii</u>	91	33
	(Stamm: "Edoug.FHB")		

TABELLE 9: Verdrängung von [³H]Naloxon im Opiatrezeptor-Bindungsassay und von [³H]FLU im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3 und 4) durch methanolische Extrakte (II.5.1.) aus Kallus-Zellkulturen; jeweils Dreifachbestimmungen. Auswahl einiger Kulturen mit hohen Verdrängungsraten in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay

Schwieriger ist die Zusammenstellung (Tabelle 9) signifikanter Testergebnisse durchgeführter Opiatrezeptor-Bindungsstudien für die Auswahl interessanter Zellkulturen zur Aufklärung des aktiven Metaboliten. Aus der Familie der Berberidaceae, in welcher, wie unter III.1.1. berichtet, eine große Häufigkeit hoher Verdrängungsraten der [3 H]Naloxon-Bindung zu finden ist, sind einige Vertreter jedoch interessant wegen ihres verhältnismäßig hohen Werts der Inhibition der [3 H]FLU-Bindung, z.B. Berberis concina und Berberis stolonifera (Stamm: V29). Die aufgeführten Podophyllum Arten sind nicht nur im Hinblick ihrer relativ starken Hemmung der [3 H]FLU-Bindung auffallend, sondern nahezu alle zeigen darüberhinaus höchste Verdrängungsraten im Opiatrezeptor-Bindungsassay. Ähnlich ist die Situation in Bezug auf die Opiatrezeptor-Aktivität bei verschiedenen Stämmen von Eschscholtzia californica und Glaucium corniculatum, bei einigen Glaucium Spezies und ausgewählten Papaveraceen. Der überwiegende Anteil aufgeführter Glaucium Arten ist zudem nur wenig aktiv in der [3 H]FLU-Verdrängung. Auffallend bei Bocconia cordata Spezies ist ihre relativ geringe Hemmung im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay gegenüber der Aktivität im Opiatrezeptor-Bindungsassay. Darüberhinaus waren Vertreter einer speziellen Familie, z.B. Annona cherimolia und Pneumus boldus in der prozentualen Verdrängung der [3 H]Naloxon-Bindung auffallend.

Das häufige Vorkommen höchster Verdrängungsraten im Opiatrezeptor-Assay bei Zellkulturen einer bestimmten Pflanzenfamilie oder Gattung legte den Schluß nahe, daß hier ein für diese Gattung oder Familie typischer Sekundärmetabolit das aktive Prinzip darstellt. Das bei vielen Berberidaceen vorkommende Jatrorrhizin zeigte in einer Konzentration von 10^{-4} M im Bindungsassay eine Hemmung der [3 H]Naloxon-Bindung von 73%. Macarpin und Dihydromacarpin, typisch für die Papaveraceae Eschscholtzia californica inhibierten die [3 H]Naloxon-Bindung um jeweils 88 und 52% in einer Kon-

zentration von 10^{-4} und 10^{-5} M. Wie bereits ARENS et al. (1982) zeigten, sind die Opiatrezeptor aktiven Metabolite bei Picralima nitida die beiden Indolalkaloide Pericin und Pericalline. Von daher wurden Vertreter dieser Zellkulturen zunächst einmal aus der näheren Auswahl (Tabelle 11) ausgeschlossen. Hauptsekundärmetabolit bei der Gattung Podophyllum ist das Podophyllotoxin (FROHNE und JENSEN, 1985). Eine 10^{-3} und 4×10^{-5} M Konzentration dieses Metaboliten im Bindungsassay (vergl. Tabelle 3) führte jeweils zu einer Hemmung der Radioligandbindung von nur 30% und 5%, so daß bei Vertretern der Gattung Podophyllum die hohen Verdrängungsraten in Opiatrezeptor-Bindungsstudien auf die Rezeptoraktivität eines oder mehrerer anderer Sekundärmetabolite zurückgeführt werden kann. Von daher wurden Zellkulturen der Gattung Podophyllum als lohnend für weitere Untersuchungen des vorliegenden aktiven Prinzips in die Liste erster Präferenz (Tabelle 11) übernommen.

Die Tabellen 10 und 11, welche die Zellkulturen zusammenfassen, die besonders interessant im Hinblick ihrer Rezeptoraktivität sind, machen deutlich, daß aus einem recht umfangreichen Angebot einer großen Anzahl untersuchter Kalluskulturen nur wenige aktive Vertreter zu finden sind, bei welchen eine weitere Klärung des aktiven Metaboliten Erfolg versprechend zu sein scheint. Diese Kalluskulturen wurden in Suspension überführt, soweit eine Suspensionskultur nicht vorhanden war. Kulturen der beiden Menispermaceae Cocculus trilobus und Stephania pierrei zeigten in Suspension generell ein äußerst schlechtes Wachstum, ähnlich war die Situation bei Glaucium und den Podophyllum emodi Stämmen. Die beiden anderen Podophyllum Arten benötigten eine recht lange Zeit der Subkultivierung, bevor ein Tonus von 7 Tagen durchgeführt werden konnte.

FAMILIE	SPEZIES	[%]INHIBITION
ASTERACEAE	<u>Lactuca sativa</u>	51
CAMPANULACEAE	<u>Jasione alpester</u>	53
FABACEAE	<u>Glycine max</u> (Stamm: "Gieso")	39
	<u>Phaseolus radiatus</u>	71
MENISPERMACEAE	<u>Cocculus trilobus</u>	73
	<u>Stephania pierrei</u>	70

TABELLE 10: Inhibition [%] der spezifischen Bindung von [³H]FLU durch methanolische Extrakte (II.5.1.) aus Kallusgewebe (Dreifachbestimmungen, vergl. Tabelle 4). Auswahl besonders Rezeptor aktiver Kallusspezies für eine weitere Untersuchung Benzodiazepinrezeptor aktiver Metabolite.

FAMILIE	SPEZIES	[%]INHIBITION
ANNONACEAE	<u>Annona cerimolia</u>	90
BERBERIDACEAE	<u>Podophyllum emodi</u> (Stamm: 262)	86
	<u>Podophyllum emodi</u> (Stamm: V38)	98
	<u>Podophyllum hexandrum</u> (Stamm: 265)	91
	<u>Podophyllum peltatum</u>	97
MONIMIACEAE	<u>Pneumus boldus</u>	96
PAPAVERACEAE	<u>Bocconia cordata</u>	70
	<u>Bocconia cordata</u> var. <u>yedoensis</u>	82
	<u>Corydalis heterocarpa</u>	79
	<u>Glaucium corniculatum</u> (Stamm: 101)	92
	<u>Glaucium corniculatum</u> (Stamm: 300)	95
	<u>Glaucium corniculatum</u> (Stamm: 301)	93
	<u>Glaucium elegans</u>	97

TABELLE 11: Inhibition [%] der spezifischen Bindung von [³H]Naloxon durch methanolische Extrakte (II.5.1.) aus Kalluszellkulturen (Dreifachbestimmungen, vergl. Tabelle 3). Auswahl besonders aktiver Kallusspezies für eine weitere Untersuchung Opiatrezeptor aktiver Metabolite.

Da eine Suspensionskultur von Bocconia cordata vorhanden war, so daß möglichst bald ausreichende Gewebemengen für präparative Zwecke zur Verfügung standen, wurde mit der Bearbeitung dieser Zellkultur in Hinblick der Aufklärung des Opiatrezeptor aktiven Prinzips begonnen. Optimal waren jedoch auch hier die Wachstumsraten nicht.

Bei Phaseolus radiatus konnte mit 71% Inhibition der [³H]FLU-Bindung ein extrem hoher Wert für die Benzodiazepin-rezeptor-Aktivität bei Extrakten aus Kallusgewebe ermittelt werden, während der Wert für den Opiatrezeptor gering blieb. Da dies auf eine gewisse Selektivität des aktiven Metaboliten für den Benzodiazepin-Rezeptor schließen ließ und die Zellen dieser Spezies in Suspension ein gutes Wachstum zeigten, wurde diese Zellkultur für eine weitere Untersuchung gewählt.

2. NACHWEIS EINES OPIATREZEPTOR AKTIVEN METABOLITEN

BEI BOCCONIA CORDATA PFLANZEN-ZELLKULTUREN

2.1. Nachweis einer Dosis-Wirkungs-Beziehung der im Extrakt gemessenen Opiatrezeptor-Aktivität

Methanolische Extrakte aus Kallusgewebe wurden in verschiedenen Verdünnungen unter Verwendung der beiden Radioliganden [³H]Naloxon und [³H]Diprenorphin im Opiatrezeptor-Bindungsassay eingesetzt (Tabelle 12).

VERDÜNNUNG	[³ H]-NALOXON	[³ H]-DIPRENORPHIN
-----	98	85
1: 2	--	41
1: 10	41	10
1: 100	29	4
1:1000	23	8

TABELLE 12: [%] Inhibition der Radioligandbindung am Opiatrezeptor in Abhängigkeit verwendeter Verdünnungen von Extrakten aus Bocconia cordata Kallusgewebe (Dreifachbestimmungen, Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3)

Gegenüber Naloxon, welches für den μ -Rezeptor eine Präferenz aufweist, bindet Diprenorphin mit vergleichbaren Affinitäten an μ -, δ - und κ -Rezeptoren. Aus diesem unterschiedlichen Bindungsverhalten der Radioliganden kann gegebenenfalls eine Präferenz des unmarkierten Verdrängers für einen dieser Rezeptoren abgelesen werden. Ein zweiter Unterschied im Bindungsverhalten besteht in der Bindungsstärke, wie Abb.2

und 3 zeigen. Es ist also generell damit zu rechnen, daß bei gegebener Affinität des unmarkierten Verdrängers die prozentuale Inhibition der spezifischen [^3H]Diprenorphin-Bindung geringer ist als jene für [^3H]Naloxon bei gleicher Verdrängerkonzentration. Dieses Ergebnis belegt Tabelle 12.

Hier konnte für beide Radioliganden bei Verdünnung eingesetzter Extrakte eine Konzentrationsabhängigkeit der bei Bocconia cordata gemessenen Opiatrezeptor-Aktivität belegt werden. Dies ist ein erster Hinweis für das Vorliegen eines Metaboliten mit spezifischem Bindungsvermögen am Opiatrezeptor bei Bocconia cordata Kallus-Zellkulturen.

2.2. Überprüfung eines methanolischen Extrakts aus der Suspensionskultur von Bocconia cordata auf eine Opiatrezeptor-Aktivität

Als nächstes galt es zu überprüfen, ob die in Suspension kultivierten Zellen von Bocconia cordata in Bezug auf den im Opiatrezeptor-Bindungsassay aktiven Metaboliten die gleiche Wirkqualität bzw. das gleiche Metaboliten-Spektrum aufwiesen wie das Kallusgewebe. Dazu wurden 5 g Gewebe ad 5 ml Methanol zur Extraktion bei 40 °C verwendet. Das Ergebnis ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

VERDÜNNUNG	[%]INHIBITION
-----	94
1: 2	65
1: 5	38
1: 10	23
1:100	3

TABELLE 13: [%] Inhibition der [^3H]Diprenorphin-Bindung am Opiatrezeptor durch Extrakte aus Suspensionskulturen von Bocconia cordata in unterschiedlichen Verdünnungen (Dreifachbestimmungen; Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3)

Unter Verwendung von [^3H]Diprenorphin konnte auch bei der Suspensionskultur von Bocconia cordata eine eindeutige Aktivität im Opiatrezeptor-Bindungsassay nachgewiesen werden. Die Inhibition der spezifischen [^3H]Diprenorphin-Bindung durch Extrakte aus suspendierten Zellen von Bocconia cordata ist wie bei jenen aus Kallusgewebe konzentrationsabhängig. Von daher konnte angenommen werden, daß das Opiatrezeptor aktive Prinzip der Suspensionskultur einem spezifischen Metaboliten von Bocconia cordata zugeordnet werden kann.

2.3. Zuordnung der Rezeptoraktivität zu einer chromatographisch detektierbaren Komponenten im methanolischen Extrakt aus Bocconia cordata Suspensionskulturen

Es wurden eine Anzahl verschiedener Laufmittel für eine dünnschichtchromatographische Auftrennung des methanolischen

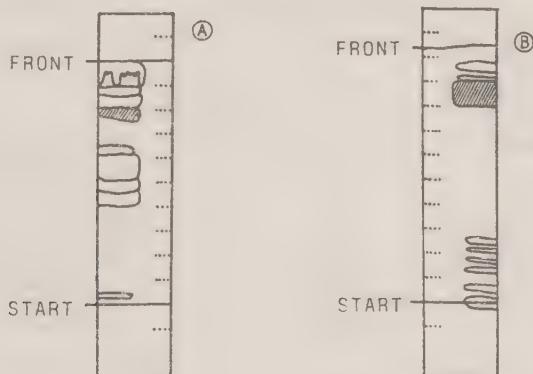


Abb 7: DC-Präparation eines methanolischen Extrakts aus Bocconia cordata Suspensionskulturen unter Verwendung von LM I (A) und LM II (B). Die Kennzeichnung (...) markiert die in Methanol eluierten Banden (Bande 0 = Bande unterhalb des Starts, Bande 11 = Bande oberhalb der Front); zu der Kennzeichnung  vergl. Tabellen 14 und 15.

Extrakt aus B. cordata Suspensionskulturen erprobt, LM I und LM II wurden für eine DC-Präparation gewählt (vergl. Abb. 7A und 7B).

Etwa 0,3-0,5 ml Extrakt (vergl. III.2.2) wurde jeweils zur präparativen DC auf DC-Folien (zuvor in Methanol gewaschen) aufgetragen. Nach erfolgter Chromatographie wurden die Folien jeweils in 1cm-Abschnitte (hier:Banden) geschnitten. Es wurde jede Bande mit Methanol eluiert (Kontrollstreifen s. Abb.7). Das Eluat wurde bis zur Trockne eingengt und der Rückstand jeweils in 0,2 ml Methanol gelöst. Die einzelnen Proben wurden im Opiatrezeptor-Bindungsassay verwendet und die prozentuale Hemmung der spezifischen [³H]Diprenorphin-Bindung ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefaßt.

PROBE	[%]-Inhibition		UV-DETEKTION BEI 366 nm
Bande 0	10		
Bande 1	17		
Bande 2	13		
Bande 3	21		
Bande 4	45		
Bande 5	9		grünliche Fluoreszenz
			rötliche Fluoreszenz
Bande 6	10		bräunlich
Bande 7	24		rötliche Fluoreszenz
Bande 8	81		gelb/orange Fluoreszenz
Bande 9	87		gelbliche Fluoreszenz
Bande 10	95		gelb/orange Fluoreszenz
			rötliche Fluoreszenz
Bande 11	66		

TABELLE 14: Zuordnung der Rezeptoraktivität ([%] Inhibition der spezifischen [³H]Diprenorphin-Bindung) zu einer chromatographisch detektierbaren Komponenten: Proben wurden durch Elution von 11 Banden einer präparativen DC erhalten (vergl. Abb.7A). Fettgedruckt sind die Werte der Proben, denen eine signifikante Aktivität zugeordnet werden konnte (Dreifachbestimmungen, Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3).

Bei der Verwendung von LM I konnte die Opiatrezeptor-Aktivität drei benachbarten Banden zugeordnet werden, den Banden 8,9 und 10. Alle zeichneten sich durch eine gelbliche oder gelblich orangefarbene Fluoreszenz aus. Die Probe maximaler Aktivität (Bande 10) besaß darüberhinaus eine rötliche Fluoreszenz (vergl. auch Abb. 7A). Die Bande (Bande 8), die die intensivste gelb orangefarbene Fluoreszenz aufwies, wurde markiert (Abb. 7A und 7B). Eine Ursache für die Verteilung signifikanter Aktivität im Opiatrezeptor-Bindungsassay auf drei Banden, könnte zurückzuführen sein auf die Menge des applizierten Extrakts. Daher wurde für eine weitere DC-Präparation (vergl. Abb. 7B) eine geringere Probenmenge an der Startlinie aufgetragen. Unter Verwendung von LM II (Tabelle 15) konnte die Aktivität einer Bande 9 zugeordnet werden, die wiederum eine gelb orangefarbene Fluoreszenz bei 366 nm zeigte.

PROBE	[%]INHIBITION	UV-DETEKTION BEI 366 nm
Bande 0	12	
Bande 1	33	bräunlich
Bande 2	25	bräunlich
Bande 3	19	bräunlich
Bande 4	19	
Bande 5	16	
Bande 6	4	
Bande 7	0	
Bande 8	7	
Bande 9	50	gelb/orange Fluoreszenz
Bande 10	25	rötliche Fluoreszenz
		gelbe Fluoreszenz
Bande 11	1	

TABELLE 15: Zuordnung der Rezeptoraktivität ([%] Inhibition der spezifischen [³H]Diprenorphin-Bindung) zu einer chromatographisch detektierbaren Komponenten: Proben wurden durch Elution von 11 Banden einer präparativen DC erhalten (vergl. Abb. 7B) erhalten. Der fettgedruckte Wert kennzeichnet die Probe, welcher ein signifikanter Wert der Opiatrezeptor-Aktivität zugeordnet werden konnte (Dreifachbestimmungen, Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3).

Auch hier wurde oberhalb der Bande gelb orangefarbener Fluoreszenz eine rötliche detektiert; dieser konnten aber hier nur 25% Inhibition der Radioligand-Bindung zugeordnet werden. Von daher kann man annehmen, daß bei der DC-Präparation in LM I die aktive Komponente aufgrund einer unzureichenden Trennung in drei Proben detektiert werden konnte.

Die Proben der beiden DC-Präparationen, welchen eine signifikante Opiatrezeptor-Aktivität (vergl. Tabellen 14 und 15) zugeordnet werden konnte, wurden einer DC-Analyse in LM I unterzogen. Bei allen Proben konnte eine Hauptkomponente gelb orangefarbener Fluoreszenz bei 366 nm beobachtet werden.

2.4. Isolation und Reinigung der aktiven Komponente aus methanolischen Extrakten aus *Bocconia cordata* Suspensionskulturen

Die Isolation und Reinigung des Opiatrezeptor aktiven Sekundärmetaboliten wurde vorwiegend anhand der Detektion der intensiv gelb orangefarbenen Komponenten (vergl. III.2.3.) vorgenommen.

Eine definierte Menge Gewebe aus Suspensionskulturen von *Bocconia cordata* wurde in Methanol extrahiert. Der konzentrierte Extrakt wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und der 10% ige methanolische Extrakt zu einer Vorreinigung auf einer XAD2-Säule (5cm x 80cm = 1,3 l Volumen, in MeOH äquilibriert) chromatographiert. Nach der Adsorption der Metabolite an das Harz, wurde die Elution mit 10% MeOH (X1-Fraktion) begonnen, das Elutionsmittel gewechselt (100% MeOH), als eine hellgelbe Trübung des Eluats nicht mehr beobachtet werden konnte. Die MeOH-Fraktion (X2-Fraktion) wurde konzentriert und der Rückstand in einem definierten

Volumen Methanol gelöst (Verwendung im Opiatrezeptor-Bindungsassay, DC-Analyse). Die X1-Fraktion wurde nach Probenentnahme (DC-Analyse) verworfen.

Nach dieser Vorreinigung des methanolischen Extrakts aus Suspensionskulturen von Bocconia cordata wurden die Fraktionen X1 und X2 chromatographiert (DC-Analyse/LM I und LM II). Nur in Fraktion X2 (sowohl vor als auch nach Konzentrierung) konnte die gelb orangefarbene Fluoreszenz in beiden Trennsystemen nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung, daß die Komponente dieser Fluoreszenz der im methanolischen Extrakt detektierten Opiatrezeptor aktiven Komponente entsprach, wurden verschiedene Verdünnungen der X2-Fraktion im Opiatrezeptor-Bindungsassay untersucht.

VERDÜNNUNG

[%]INHIBITION

-----	97
1: 2	87
1: 5	40
1: 10	24
1: 100	8
1:1000	0

TABELLE 16: Nachweis einer Opiatrezeptor Aktivität der X2-Fraktion : Inhibition [%] der spezifischen [³H]Diprenorphin-Bindung durch einen XAD2-säulenchromatographisch vorgereinigten Extrakt aus B. cordata Suspensionskulturen verschiedener Konzentrationen (Dreifachbestimmungen, Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3)

In der untersuchten X2-Fraktion konnte die Opiatrezeptor aktive Komponente detektiert und eine konzentrationsabhängige Wirkung nachgewiesen werden.

Zur weiteren Reinigung und Isolation dieser Komponenten wurden verschiedene Trennmaterialien, z.B. Lichroprep RP8 getestet. Erst erneute Erprobung verschiedener Laufmittelsysteme ermöglichte eine chromatographische Trennung des gelb orangefarben fluoreszierenden Metaboliten von zahlreichen Verunreinigungen des vorgereinigten Extrakts.

Unter Verwendung von LM III als erstes Elutionsmittel und LM I als zweitem Elutionsmittel wurde ein definiertes Volumen der konzentrierten X2-Fraktion auf einer Kieselgelsäule (4,5cm x 100cm = 1,4 l Volumen, äquilibrirt in LM III) chromatographiert. Das Elutionsprofil ist in Abb.8 wiedergegeben. Die einzelnen Fraktionen wurden DC analytisch (Verwendung von LM III) auf die im UV-Licht detektierbare Wirkkomponente überprüft.

In folgenden Reinigungsschritten bestand das Problem darin, die in Abb. 8 C wiedergegebenen Komponenten voneinander zu trennen. Bei keinem der untersuchten Laufmittelsysteme bzw. Säulenmaterialien wurde eine bessere Trennung der aktiven Komponente von der rötlich fluoreszierenden möglich. Die Reinigung der Wirkkomponente wurde durch wiederholte DC-Präparation unter Verwendung von LM III möglich. Die Elution der Substanz erfolgte dabei mit Methanol. Zur Abtrennung dabei eluierter Kieselgelverunreinigungen erfolgte ein letzter Reinigungsschritt auf einer Sephadex LH20 Säule (3,5cm x 75 cm = 0,8 l Volumen, äquilibrirt in MeOH). Das Lösungsmittel (MeOH) wurde abgezogen und anschließend erfolgte die Trocknung (Exsikkator(CaCl₂), Vakuumpumpe) der orangefarbenen Substanz.

Aus 15,6 g Gewebe (FG, Ausbeute pro Kolben mit 250 ml Kulturmedium) konnten nur 0,6 mg Substanz (reinst!) isoliert werden, eine Ausbeute von 3,8%. Demzugrunde lag nicht eine geringe Wirkstoffkonzentration im methanolischen Extrakt von

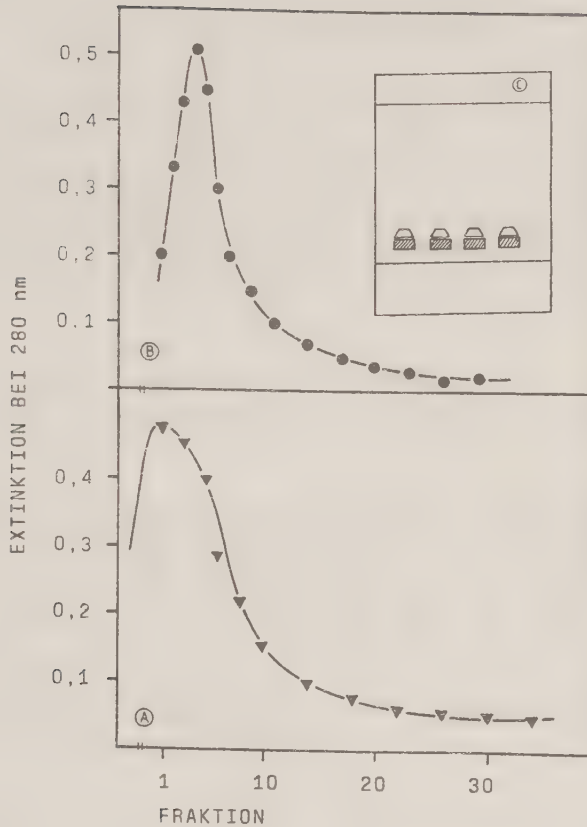


Abb. 8: Kieselgelsäulenchromatographie eines XAD2 chromatographisch vorgereinigten Extrakts aus *Bocconia cordata* Suspensionskulturen unter Verwendung von LM III (A) und LM I (B): Die Detektion erfolgte bei 280 nm; bei erreichter minimaler Extinktion (A) wurde die Elution mit LM I (B) fortgesetzt. Die DC-Analyse (C) gibt die Detektion einer gelb orangefarbenen Fluoreszenz  sowie einer rötlichen in Fraktionen minimaler Extinktion (B) wieder.

Bocconia cordata, sondern die problematische Trennung der Substanz von einer rötlich fluoreszierenden Komponente.

2.5. Identifizierung des Opiatrezeptor aktiven Metaboliten bei Bocconia cordata Suspensionskulturen

Da es sich bei dem isolierten Metaboliten, wie bereits unter III.2.4. erwähnt, vermutlich um eine Hauptkomponente bei Bocconia cordata handelte, wurden entsprechende Referenzsubstanzen, für diese Spezies typische Sekundärmetabolite zusammen mit dem methanolischen Extrakt aus Bocconia cordata Suspensionskulturen chromatographiert. Das Ergebnis der DC-Analyse wird in Abb. 9 vorgestellt.

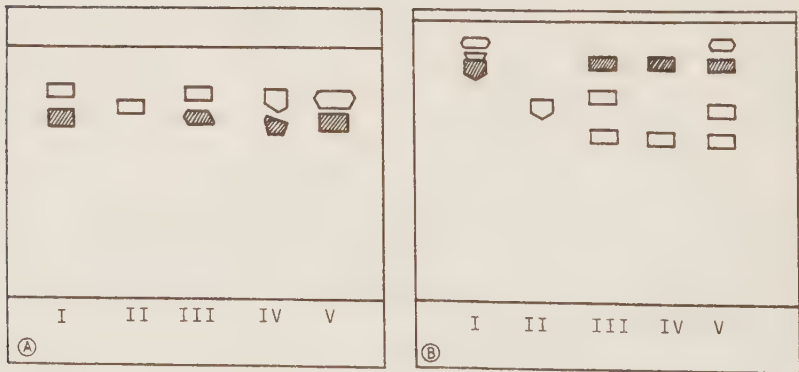


Abb.9: DC-Analyse eines methanolischen Extrakts aus Bocconia cordata Suspensionskulturen (I) und folgender Referenzen: Macarpin (II), Sanguinarin (III), Chelerythrin (IV) sowie ein Gemisch aus I-IV (V). Verwendung fanden Laufmittel LM I (A) und LM II (B). Die Detektion erfolgte bei 366 nm; eine intensiv gelb orangefarbene Fluoreszenz  wurde detektiert.

Um annähernd gleiche Chromatographiebedingungen zu erreichen, wurde ein entsprechend verdünnter Extrakt appliziert. Die Referenzen wurden in Methanol gelöst. Wie in Abb.9 ersichtlich waren alle Referenzsubstanzen außer Macarpin leicht verunreinigt. Die gelb orangefarbene Fluoreszenz konnte Sanguinarin (III) zugeordnet werden, mit jeweils einem Rf-Wert von 0,69 (LM I) und 0,84 (LM II). Bei der Co-Chromatographie des Gemisches konnte nur eine Bande mit dieser Fluoreszenz beobachtet werden. Dies deutete daraufhin, daß es sich bei der isolierten Substanz aller Wahrscheinlichkeit nach um Sanguinarin handelte. Es galt, dies bei der isolierten Komponenten zu überprüfen.

Von der aus Bocconia cordata isolierten Wirkkomponente und Sanguinarin (Roth) wurde jeweils ein Massenspektrum aufgenommen:

MS (EI) m/z (rel. Intensität %): 332 (M+,27), 317 (100), 259
(14), 201 (34), 174 (20),
158 (48)

Es konnte für beide Substanzen ein Molekulargewicht von 332 g/Mol sowie eine gleiche Fragmentation massenspektroskopisch ermittelt werden (vergl. Abb.10).

Um einen weiteren Beweis zu erhalten, daß es sich bei der isolierten Verbindung um Sanguinarin handelte, wurde ein ¹H-NMR-Spektrum dieser Komponenten (Abb.11) und der Sanguinarin-Referenz aufgezeichnet.

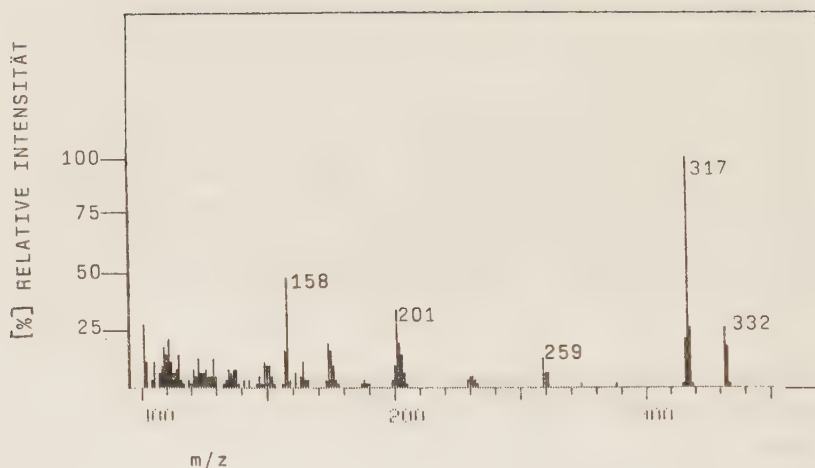


Abb. 10: Massenspektrum (EI) der aus Bocconia cordata Suspensionskulturen isolierten Substanz.

Im Aromatenbereich konnten bei der Referenz Sanguinarin folgende Protonen zugeordnet werden: 84,92 (3H, s, N-CH₃), 86,35 (2H, s, C-2/3 -OCH₂O), 86,61 (2H, s, C-7/8 - OCH₂O), 87,78 (1H,s, H-1), 88,13 (1H, d, 8,7 Hz, H-10), 88,28 (1H, s, H-4), 88,3 (1H,d, 9,0 Hz, H-12), 88,65 (1H,d, 9,0 Hz; H-11), 88,79 (1H, d, 8,7 Hz, H-9), 810,15 (1H, s, H-6).

In Übereinstimmung mit dem ¹H-NMR-Spektrum der Referenz und der Literatur (BLASKO et al., 1988) konnte die aus Bocconia cordata isolierte Opiatrezeptor aktive Komponente eindeutig als Sanguinarin identifiziert werden.

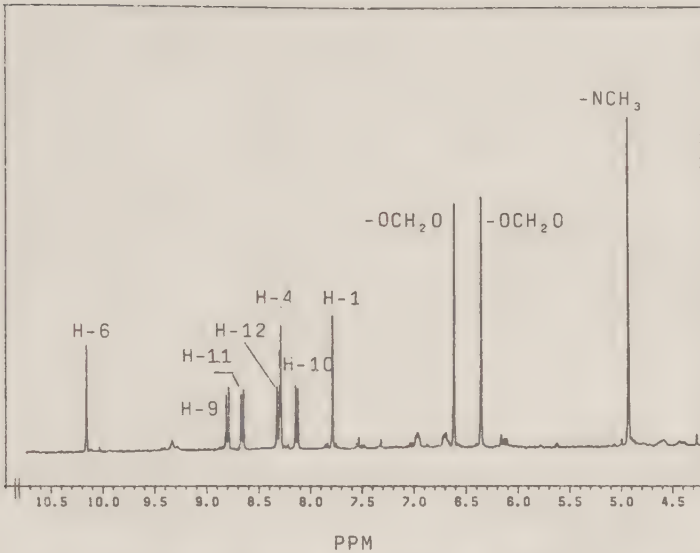


Abb. 11: ^1H -NMR-Spektrum in $\text{DMSO}-\text{D}_6$ der isolierten Wirkkomponenten aus *Bocconia cordata* Suspensionskulturen

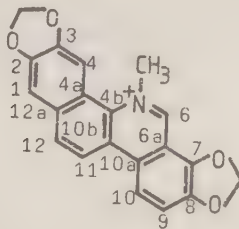


Abb. 12: Strukturformel von Sanguinarin aus *Bocconia cordata* Suspensionskulturen; zur Zuordnung vergl. auch BLASKO *et al.*, 1988.

2.6. Nachweis einer Opiatrezeptor-Aktivität von Sanguinarin aus Bocconia cordata Zellkulturen

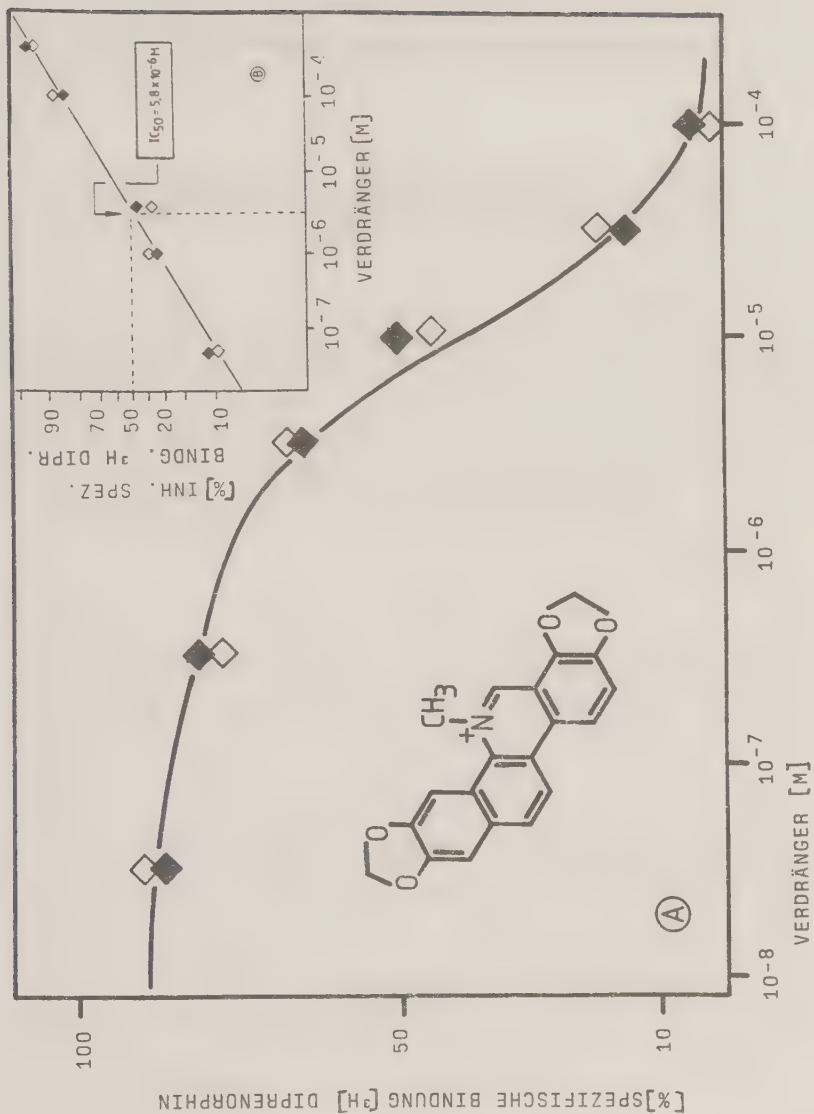
Verschiedene Konzentrationen des aus Bocconia cordata isolierten Sanguinarins und der Referenz wurden im Opiatrezeptor-Bindungsassay verwendet. Das Ergebnis des "Displacement"-Experiments ist in Abb. 13 und Tabelle 17 zusammengestellt.

Der aus dem logit-log-Plot (Abb. 13B) ermittelte IC_{50} -Wert für Sanguinarin beträgt $5,8 \times 10^{-6} M$. Einen Vergleich der Opiatrezeptor-Aktivität von Sanguinarin und gemessenen Opiaten gibt Tabelle 17.

LIGAND	IC_{50} [M]
Diprenorphin	$1,7 \times 10^{-9}$
Morphin	$1,9 \times 10^{-7}$
Sanguinarin	$5,8 \times 10^{-6}$
Codein	$1,6 \times 10^{-5}$

TABELLE 17: Verdrängung von [3H]-Diprenorphin durch verschiedene unmarkierte Liganden im Opiatrezeptor-Assay. Die Ermittlung der IC_{50} -Werte, der Konzentration der Verdränger, bei welcher die Radioligandbindung um 50% gehemmt wird, wurde mit 6-8 verschiedenen Konzentrationen ermittelt aus einem logit-log-Plot, jeweils durch drei Einzelbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3).

Abb.13: Verdrängung spezifisch gebundenen [3H]Diprenorphin durch Sanguinarin aus Bocconia cordata Zellkulturen (◆) und der Referenz (◇ /Roth) im Opiatrezeptor-Bindungsassay; jeweils Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 3; sigmoidale Hemmungskurven (A), logit-log-Plot (B)



3. AUFLÄRUNG DES BENZODIAZEPINREZEPTOR AKTIVEN PRINZIPS BEI PHASEOLUS RADIATUS PFLANZEN-ZELLKULTUREN

3.1. Überprüfung eines methanolischen Extrakts aus suspendierten Zellen von Phaseolus radiatus auf eine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität

Die Benzodiazepinrezeptor-Aktivität eines methanolischen Extrakts aus Kallusgewebe und suspendierten Zellen von Phaseolus radiatus wurde ermittelt. Dazu wurden 5 g Gewebe (Suspensionskultur) ad 50 ml Methanol bei 40 °C über Nacht extrahiert; der Extrakt konzentriert auf ein Volumen von 5 ml. Zur Extraktion aus Kallusgewebe vergl. II.5.1.. Extrakte dieser Konzentration wurden im Bindungsassay verwendet (Tabelle 18).

<u>Phaseolus radiatus</u>	[%] INHIBITION
Kalluskultur	51
Suspensionskultur	49

TABELLE 18:Verdrängung der spezifischen Bindung von [³H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch Extrakte aus Phaseolus radiatus Zellkulturen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt(Inkubationsbedingungen vergl.Tabelle 4).

Sowohl bei der Kalluskultur als auch der Suspensionskultur konnte eine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität ermittelt werden. Im Vergleich mit dem unter III.1.1. (Tabelle 7) erhaltenen Wert ist der hier bei der Kalluskultur erreichte

deutlich niedriger, d.h. es wurde aus Zellen mit geringerem Gehalt des aktiven Metaboliten extrahiert. Der Wert, welcher bei Verwendung von Extrakten aus suspendierten Zellen erhalten wurde, ist ähnlich niedrig. Auch hier wurde ein Konzentrationseffekt zugrundegelegt.

3.2. Nachweis einer Dosis-Wirkungs-Beziehung im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay bei Extrakten aus Phaseolus radiatus Zellkulturen

Die Überprüfung einer Konzentrations abhängigen Aktivität in Extrakten aus Phaseolus radiatus Zellkulturen im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay gab einen ersten Hinweis darauf, ob die in den Extrakten detektierten Aktivitäten auf ein spezifisches Bindungsvermögen eines oder mehrerer Metabolite am Rezeptor zurückzuführen waren oder eine ganz unspezifische Hemmung der Radioligand-Bindung darstellten.

Der unter III.3.1. hergestellte methanolische Extrakt aus Kallusgewebe wurde bis zur Trockne konzentriert und in 0,5 ml Methanol gelöst. Helle Partikel fielen dabei aus. Es wurde zentrifugiert (2000 Upm, RT, 3 min). Nur der klare (!) Überstand wurde im Bindungsassay eingesetzt. Auch der methanolische Extrakt aus suspendiertem Gewebe (vergl. III.3.1.) wurde bis zur Trockne konzentriert, der Rückstand ebenfalls in 0,5 ml Methanol gelöst, die Lösung zentrifugiert und der Überstand zur Ermittlung der Rezeptoraktivität verwendet.

Extrakte dieser Konzentration sowie verschiedene Verdünnungen (Tabelle 19) zeigten eine Dosis abhängige Verdrängung der Radioligand-Bindung im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay.

VERDÜNNUNG	KALLUSKULTUR	SUSPENSIONSKULTUR
-----	88	66
1: 1	85	67
1: 5	71	43
1: 10	52	28
1:100	0	2

TABELLE 19: [%] Inhibition der spezifischen Bindung von [³H]-FLU am Benzodiazepin-Rezeptor durch methanolische Extrakte verschiedener Verdünnungen aus Phaseolus radiatus Pflanzen-Zellkulturen. Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen sind aufgeführt (Inkubationsbedingungen s. Tabelle 4).

Ein Nachweis der konzentrationsabhängigen Wirkung methanolischer Extrakte aus Zellkulturen von Phaseolus radiatus konnte erbracht werden. Die hier maximal erreichten Werte liegen jedoch bei der Suspensionskultur mit nur 66% relativ niedrig. Bemerkenswert ist, daß eine 1:1 Verdünnung dieses Extrakts keine merkliche Verminderung der prozentualen Inhibition der Radioligand-Bindung zeigt. Dies könnte auf das Vorliegen mehrerer aktiver Metabolite mit unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten zurückzuführen sein. Den gleichen Effekt beobachtet man bei der Kalluskultur, bei der die Werte insgesamt höher liegen. Wie bereits unter III.3.1. angenommen, konnte durch die Konzentrierung der Extrakte jeweils eine höhere prozentuale Inhibition der Radioligand-Bindung erreicht werden.

3.3. Zuordnung einer im Rezeptorassay gemessenen Aktivität zu chromatographisch detektierbaren Komponenten

Zur chromatographischen Trennung der einzelnen Extraktkomponenten sowie Zuordnung der Benzodiazepinrezeptor Aktivität zu

einem spezifischen Metaboliten wurden verschiedene Laufmittelsysteme erprobt. Zunächst wurde LM IV zur präparativen DC eines Rohextrakts aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen (142 g FG/700 ml MeOH) gewählt. Das Ergebnis der Präparation zeigt Abb. 14.

Die hier blau fluoreszierenden Banden wurden ausgeschnitten und mit Methanol eluiert. Nach der Konzentrierung des Eluats wurde der Rückstand in 0,2 ml Methanol gelöst und im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay untersucht (Tabelle 20). Zwei signifikante Werte der Radioligand-Verdrängung wurden beobachtet in Probe 1, der am Start befindlichen Bande und Probe 4; hier konnte einer intensiv blau fluoreszierenden Komponenten eine signifikante Verdrängungsrate von 71% zugeordnet werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß die am Start

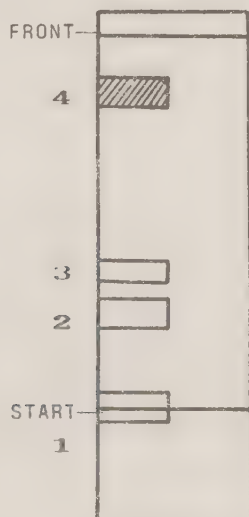


Abb. 14: DC-Präparation eines methanolischen Extrakts aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen. Alle hier bei 366 nm detektierten Komponenten zeigen eine blaue Fluoreszenz. Zu der Kennzeichnung von Bande 4 (vergl. Tabelle 20). ▨

BANDE	R _f - WERT	[%] INHIBITION
1	0,00	39
2	0,25	4
3	0,38	6
4	0,86	71

TABELLE 20: Inhibition der spezifischen Bindung von [³H]-FLU am Benzodiazepin-Rezeptor durch vier im UV-Licht (366 nm) detektierbare Banden einer DC-Präparation eines methanolischen Extraktes aus Ph. radiatus (vergl. Abb.14). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (Inkubationsbedingungen s. Tabelle 4).

befindliche Fraktion glykosidisch gebundene Sekundärmetabolite enthielt, war gegeben (Verwendung eines spezifischen Sprühreagenz vergl. II.7.1.). Um diese abzutrennen und damit die Rezeptoraktivität eindeutiger zuzuordnen, wurde eine Vorreinigung auf einer XAD2-Säule (5cm x 65 cm, 1,0 l Volumen, in 10% MeOH äquilibriert) vorgenommen (vergl. III.2.4.). Das Ergebnis ist in Tabelle 21 zusammengefaßt.

FRAKTION	[%] INHIBITION
X1	59
X2	60
X3	74

TABELLE 21: Prozentuale Inhibition der spezifischen Bindung von [³H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch Fraktionen eines XAD-2 säulenchromatographisch gereinigten Extraktes aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt (Inkubationsbedingungen s. Tabelle 4). (X1 = Durchlauf des 10% methanolischen Extrakts; X2 = Fraktion bei Elution mit 10% MeOH; X3 = Fraktion mit 100% MeOH). Ein Aliquot (10 ml) der einzelnen Fraktionen war bis zur Trockne eingengt und in 0,5 ml des jeweiligen Lösungsmittels eluiert worden.

In allen drei Fraktionen konnte eine signifikante Benzodiazepinrezeptor-Aktivität ermittelt werden. Da der Wert für Fraktion X3 die höchste Verdrängungsrate zeigte, wurde diese Fraktion zunächst für weitere Untersuchungen gewählt.

LM V wurde für eine DC-Präparation der X3- Fraktion gewählt. Das Eluat einzelner Fraktionen (vergl. Abb.15; Tabelle 22) wurde konzentriert und nachfolgend in 0,25 ml Methanol gelöst. Die einzelnen Fraktionen wurden auf eine Hemmung der [^3H]FLU-Bindung untersucht.

Die Zuordnung einer signifikanten Rezeptoraktivität für die Fraktionen X3-DC4 und X3-DC5 konnte vorgenommen werden. Eine erneute Präparation der X3-Fraktion (konzentriert, Applikationsvolumen ca. 10 ml) im gleichen Trennsystem erfolgte auf

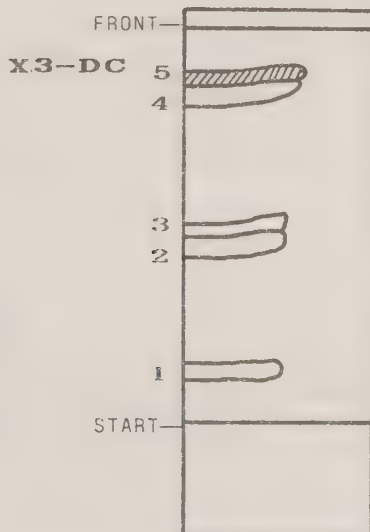


Abb. 15: DC-Präparation der X3-Fraktion unter Verwendung von LM V (Detektion bei 366 nm; vergl. Tabelle 22). Zur Kennzeichnung von Bande 5 (Fraktion X3-DC5) vergl. Tabelle 22. ▨

FRAKTION	[%]INHIBITION	FLUORESZENZ
X3-DC1	--	blau (schwach)
X3-DC2	9	blaugrün
X3-DC3	10	blau (schwach)
X3-DC4	66	blau (schwach)
X3-DC5	74	blau (intensiv)

TABELLE 22: Prozentuale Inhibition der spezifischen Bindung von [^3H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch Fraktionen einer DC-Präparation der X3-Fraktion eines XAD-2 säulenchromatographisch gereinigten Extrakts (Aliquot) aus Ph. radiatus Suspensionskulturen. UV-Detektion erfolgte bei 366 nm. Zur Bezeichnung der Banden 1-5 (Abb.15) wurde die Benennung X3-DC1 bis X3-DC5 vorgenommen. Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen sind angegeben (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4). (Fettdruck: Maximale Inhibition [%]).

einer Kieselgelsäule (2,5 cm x 45 cm, 0,35 l Volumen, äquibriert in LM V). Fünf Fraktionen wurden gesammelt (DC-Analyse im gleichen Trennsystem), bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in jeweils 10 ml Methanol gelöst. In allen Fraktionen konnte bei Verwendung der jeweiligen Konzentration der im Bindungsassay eingesetzten Proben eine signifikante Rezeptoraktivität ermittelt werden (Tabelle 23).

FRAKTION	[%]INHIBITION
X3-KI	82
X3-KII	88
X3-KIII	85
X3-KIV	70
X3-KV	56

TABELLE 23: Inhibition [%] der spezifischen Bindung von [^3H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch Fraktionen einer Kieselgel säulenchromatographisch gereinigten Fraktion X3 (vergl. XAD-2-Säulenchromatographie). Rückstand der konzentrierten Fraktionen jeweils in 10 ml Methanol gelöst im Bindungsassay verwendet. Jeweils Dreifachbestimmungen wurden durchgeführt (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4). (Fettdruck: Maximal erreichte Inhibition [%])

Es konnte wie aus Tabelle 23 ersichtlich keine gute Trennung erreicht werden, geht man davon aus, daß nicht eine Vielzahl von Metaboliten rezeptoraktiv wirksam sind. Es wurden die Fraktionen höchster Verdrängungsraten, Fraktion X3-KII und X3-KIII, vereinigt; ein Aliquot dieser Fraktion X3K wurde präparativ chromatographiert (LM V). Nach Elution der Banden (Fraktionen X3K-DC1 bis X3K-DC6) mit Methanol wurde die Rezeptoraktivität der konzentrierten Proben ermittelt (Tabelle 24).

FRAKTION	R _f -WERT	[%] INHIBITION
X3K-DC1	0,00	16
X3K-DC2	0,25	48
X3K-DC3	0,28	68
X3K-DC4	0,77	82
X3K-DC5	0,84	82
X3K-DC6	0,85	62

TABELLE 24: Inhibition [%] der spezifischen Bindung von [³H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch Fraktionen einer DC-Präparation vereinigter Fraktionen X3-KII und X3-KIII (=XK3). Die Elution der Banden (Detektion bei 366 nm) erfolgte mit MeOH, eine Konzentrierung auf ein Volumen von 0,35 ml. Die Daten wurden durch Doppelbestimmungen ermittelt (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4). (Fettdruck: Maximale Verdrängungsraten)

Maximale Verdrängungsraten wurden bei den Fraktionen X3K-DC3 und X3K-DC4 (blau fluoreszierend) erreicht. Eine Hilfe zur besseren Zuordnung der Benzodiazepinrezeptor-Aktivität wurde durch eine DC-Analyse (Verwendung von LM V) möglich (Abb.16).

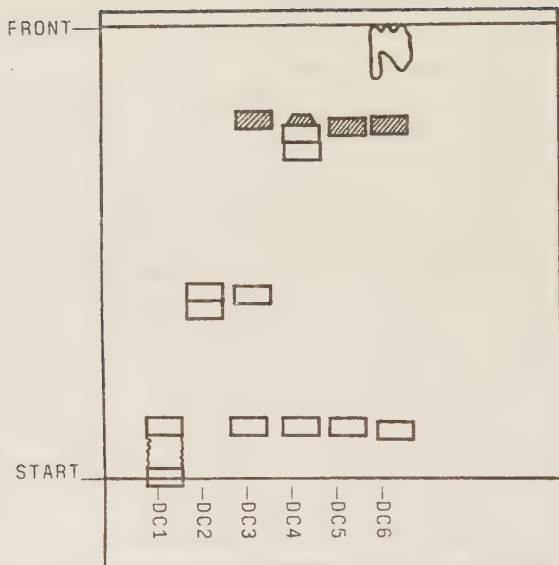


Abb. 16: DC-Analyse (LM V) der Fraktionen X3K-DC1 bis X3K-DC6 (Detektion der Banden bei 366 nm). Zur Kennzeichnung vergl. Text sowie Tabelle 24. Die gekennzeichnete Komponente zeigte eine intensiv blaue Fluoreszenz und einen R_f -Wert von 0,8.

Im Vergleich der Abb. 16 mit Tabelle 24 erkennt man, daß bei Detektion einer blau fluoreszierenden Komponenten (siehe gekennzeichnete  Bande, R_f -Wert: 0,8) die Verdrängungsraten für $[^3\text{H}]\text{FLU}$ signifikant hoch sind ($> 60\%$). Betrachtet man die entsprechenden R_f -Werte der DC-Präparation (keine Abbildung !) so kann man feststellen, daß die Fraktion X3K-DC4 einen R_f -Wert von 0,77 bei einer Inhibition von 82% aufweist. Die Fraktion X3K-DC5 zeichnet sich durch einen R_f -Wert von 0,84 und eine Hemmung von 82% aus. Aus diesem Grund konnte die Komponente der DC-Analyse mit dem relativ

hohen R_f -Wert und der blauen Fluoreszenz der Benzodiazepin-rezeptor-Aktivität aller Wahrscheinlichkeit nach zugeordnet werden.

Im folgenden galt es zu überprüfen, ob diese Komponente in Fraktion X3K-DC3 allein der aktive Metabolit war, ob in Fraktion X3K-DC4 nicht die grünlich und blaue Komponente mit hohem R_f -Wert, sondern die Komponente mit einem R_f -Wert von 0,8 die aktive darstellte. Daher wurden beide Fraktionen erneut präparativ in LM V chromatographiert (Abb. 17).

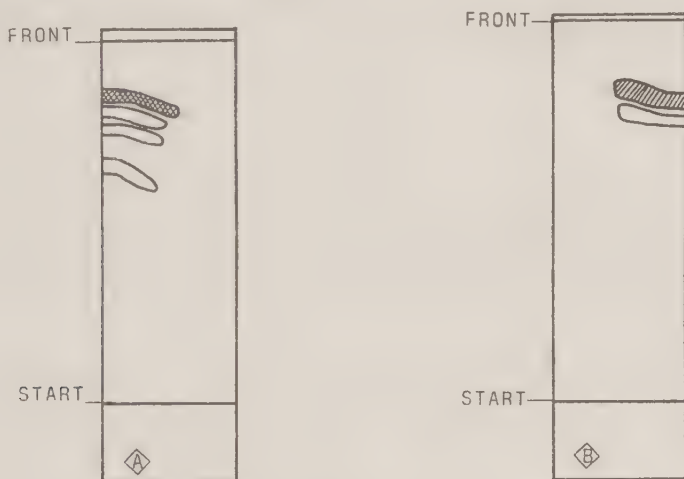


Abb. 17: DC-Präparation der Fraktionen X3K-DC3 (A) und X3K-DC4 (B). Die Banden (Numerierung ausgehend vom Start in Fließrichtung) wurden entsprechend mit X3K-DC3-1 bis X3K-DC3-4 und X3K-DC4-1 sowie X3K-DC4-2 bezeichnet. Zur jeweiligen Kennzeichnung  und  vergl. Tabelle 25; ebenso entsprechende R_f -Werte. Die Detektion erfolgte bei 366 nm.

Nach erfolgter Elution der Banden (Abb. 17) mit Methanol, Konzentrierung des Eluats und Lösen des Rückstands in 0,35 ml Methanol wurden im Rezeptorassay die einzelnen Verdrängungsraten erhaltener Fraktionen bestimmt (Tabelle 25).

FRAKTION	R _f -WERT	[%] INHIBITION
X3K-DC3-1	0,62	31
X3K-DC3-2	0,74	65
X3K-DC3-3	0,79	67
X3K-DC3-4	0,83	81
X3K-DC4-1	0,77	60
X3K-DC4-2	0,83	77

TABELLE 25: Inhibition [%] der spezifischen Bindung von [³H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch Fraktionen einer DC-Präparation (Abb. 17) vorgereinigter Fraktionen X3K-DC3 und X3K-DC4. Die Detektion erfolgte bei 366 nm. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4). (Fettdruck: maximal erreichte Inhibition beider Präparationen)

Die Fraktionen mit höchster Inhibition, jeweils 81 und 77%, besaßen beide einen R_f-Wert von 0,83. Um zu verifizieren, ob es sich bei beiden Metaboliten um dieselbe oder zwei verschiedene Komponenten blauer Fluoreszenz handelte, wurden beide in einem LM VI chromatographisch gereinigt. Es wurden insgesamt 3 Komponenten mit jeweils blauer Fluoreszenz, aber geringfügigen Unterschieden im R_f-Wert gereinigt. Entsprechend der DC-Analyse dieser drei Komponenten (Abb.18) wurden die Banden in Abb. 17A und 17B entsprechend gekennzeichnet.

Die in Abb.18 wiedergegebenen aktiven Metabolite wurden entsprechend der Reihenfolge ihrer chromatographischen Auftrennung (vergl. R_f-Werte Tabelle 26) mit WK1, WK2 und WK3 (WK = Wirkkomponente) bezeichnet. WK3 wurde bei präparativen Dünnschichtchromatographien von WK2 erhalten. Eine Abschätzung der Wirkstärke dieser Komponenten gibt Tabelle 26 wieder.

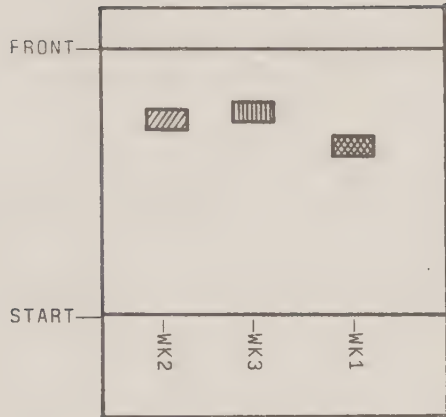


Abb. 18: DC-Analyse dreier Benzodiazepinrezeptor aktiver Komponenten aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen unter Verwendung von LM VI. Die Detektion erfolgte bei 366 nm. Zu den R_f -Werten der einzelnen Metabolite siehe Tabelle 26.

FRAKTION	R_f -WERT	E_{342}	[%]INHIBITION
WK1	0,62	0,933	96
WK2	0,66	0,279	46
WK3	0,76	0,247	32

TABELLE 26: Prozentuale Inhibition der spezifischen Bindung von [3 H]-FLU am Benzodiazepinrezeptor durch drei isolierte Wirkkomponenten WK1, WK2, WK3 (vergl. Abb.18). Detektion bei 366 nm zeigte jeweils eine blaue Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität. Extinktion (Messung in MeOH) zur ungefähren Abschätzung der Wirkstärke wurde photometrisch bestimmt. Verdrängungsraten geben Mittelwerte von Dreifachbestimmungen wieder (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4).

Da zwischen Konzentration und Wirkstärke ein logarithmisches Verhältnis besteht (vergl. II.4.3.), konnte anhand der ermittelten Werte für Extinktion und Inhibition [%] der [³H]FLU-Bindung (Tabelle 26) keine Aussage über die relative Affinität der drei Verbindungen zum Benzodiazepinrezeptor gemacht werden.

Für eine Strukturaufklärung der aktiven Metabolite galt es nun, größere Mengen der Komponenten zu isolieren. Die Entscheidung die hier in Abb. 18 detektierten Verbindungen zu isolieren, ergab sich einmal aus den für sie in den einzelnen Schritten der Zuordnung ermittelten Maximalwerten (vergl. Tabellen 21-25) sowie der Abschätzung ihrer Konzentration im Rohextrakt. Man kann davon ausgehen, daß Substanzen, welche nur in Spuren vorkommen, nicht in ausreichenden Mengen für eine Strukturaufklärung zur Verfügung stehen. Es konnte darüberhinaus nicht ausgeschlossen werden, daß die gefundene Aktivität anderer Fraktionen einzelner Präparationen nicht auf die in Abb. 18 wiedergegebenen Komponenten zurückzuführen war, da eine scharfe Trennung einzelner Banden nicht eindeutig belegt ist.

Ausgehend von der Konzentration der Wirkmetabolite im methanolischen Rohextrakt wurde mit der Isolation und Reinigung von der Komponenten WK1 aus Suspensionskulturen von Phaseolus radiatus begonnen (vergl. III.3.5).

3.4. Nachweis glykosidischer Bindung chromatographisch zugeordneter Wirkkomponenten

Wie bereits unter III.3.3. erwähnt, wurde schon sehr früh vermutet, daß die aktiven Komponenten in glykosidisch gebundener Form in Zellkulturen von Phaseolus radiatus vorliegen.

Zum einen konnte bei der DC-Präparation eines methanolischen Extrakts (vergl. Tabelle 20) am Start eine intensiv blaue Fluoreszenz beobachtet werden mit einer Inhibition der Radioligandbindung von 39 %. Da im gewählten Laufmittelsystem polare Verbindungen kaum löslich sein dürften, handelt es sich bei Verbindungen, welche am Start verweilen, um mehr hydrophile Komponenten, wie z.B. Glykoside. Unter Verwendung des unter II.7.1. angegebenen Glykosid spezifischen Sprühreagenz konnte wie bereits erwähnt (III.3.3.) eine positive Reaktion (Braunfärbung) am Start detektiert werden (Abb.14). Eine weitere Beobachtung gibt Tabelle 21 wieder. Die polaren Fraktionen X1 und X2 der XAD2-Säulenchromatographie zeigen neben einer intensiv blauen Fluoreszenz am Start (DC-Analyse, LM V) relativ hohe Verdrängungsraten im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay. Die sirupöse Konsistenz dieser Fraktionen ließ auf einen relativ hohen Zuckeranteil schließen. Präparationen, bei welchem eine methanolische Extraktion aus lyophyllisiertem Gewebe vorgenommen wurde, zeigten ausschließlich die am Start befindliche Komponente blauer Fluoreszenz, WK1 war in solchen Rohextrakten nicht detektierbar.

Von der Fraktion X1 der XAD2-Säulenchromatographie (vergl. III.3.3.) wurde ein Aliquot entnommen und 0,01 ml konz. HCl ad 0,75 ml für 2h bei 95 °C inkubiert. Ein Aliquot der nicht hydrolysierten X1-Fraktion und der hydrolysierten Probe (jetzt braun gefärbt) wurden in LM V chromatographiert (DC-Analyse). In der hydrolysierten Probe konnten zahlreiche fluoreszierende Komponenten detektiert werden, während bei der Kontrolle nur die am Start befindliche intensiv blaue Fluoreszenz bei 366 nm detektiert wurde. Bei einem weiteren Aliquot der X1-Fraktion wurde das Methanol (10%) unter Vakuum abgezogen. Ad 1,0 ml Probe wurde zur Hydrolyse β -Glukosidase (Roth) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Das Ergebnis der DC-Analyse der Kontrolle und hydrolysierten Probe gibt Abb. 19 wieder.

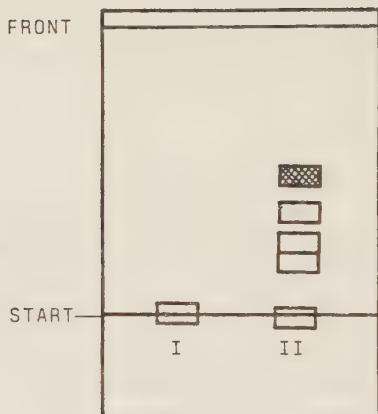


Abb. 19: DC-Analyse (LM VI) der X1-Fraktion (vergl. III.3.3.) als Kontrolle (I) und nach Zugabe von β -Glukosidase (II), vergl. Text oben (III.3.4.). Detektion bei 366 nm

Abb. 19 belegt die glucosidische Bindung von Komponenten bei Phaseolus radiatus, ad rem das Vorliegen der detektierten (366 nm) Wirkkomponenten (III.3.3.) in β -glukosidischer Bindung. Unter Verwendung eines spezifischen Sprühreagens (II.7.1.) konnten die am Start befindlichen Komponenten als Glykoside identifiziert werden.

Die Wirksamkeit endogener Hydrolasen bei Phaseolus radiatus Zellkulturen wurde durch Suspendieren des Gewebes in Wasser überprüft (vergl. II.5.2.9): Etwa 4,5 g Gewebe wurde nach Abtrennen des Kulturmediums in 25 ml Wasser für 2d bei 37 °C inkubiert (Autolyse) und nachfolgend nach Abtrennen des Wassers im gleichen Volumen Methanol extrahiert. Zur Kontrolle wurde Gewebe (4,5 g FG) direkt im Anschluß des

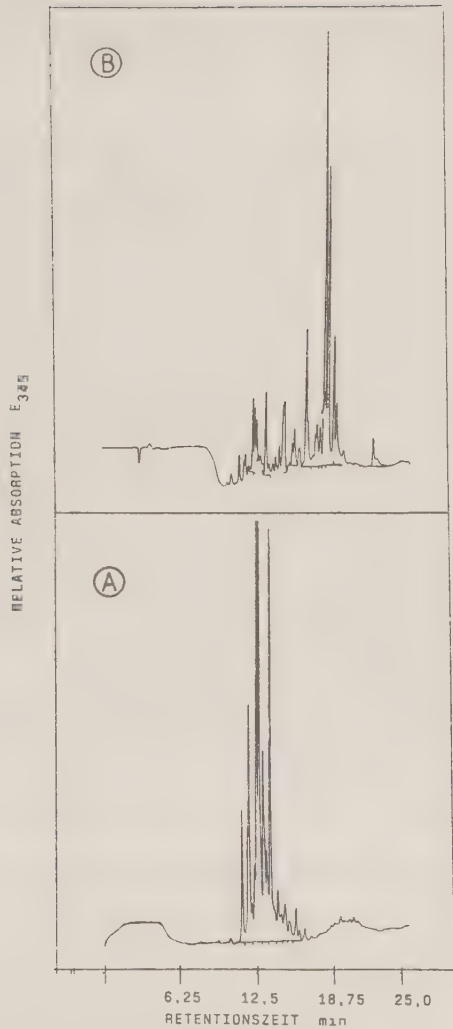


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm eines ethanolischen Extrakts aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen (A) und eines methanolischen Extrakts aus zuvor autolysiertem Gewebe (B), vergl. Text oben (III.3.4.). Zu den Chromatographie-Bedingungen der analytischen Trennung vergl. II.7.3.).

Abtrennens vom Kulturmedium in 80 % siedendem Ethanol für 20 min extrahiert. Die Chromatogramme der jeweiligen HPLC-Auftrennung der Extraktkomponenten sind in Abb. 20 wiedergegeben.

Der zur HPLC-Trennung der jeweiligen Extraktkomponenten verwendete Gradient (II.7.3.) nimmt innerhalb von 20 min im Anteil des apolaren Elutionsmittels zu. Daraus kann gefolgert werden, daß hydrophile Komponenten, z.B. Glykoside früher als weniger hydrophile oder apolare Metabolite eluiert werden. Der EtOH-Extrakt zeigt bei der HPLC-Trennung eine Elution der Metabolite innerhalb von 10-16 min, demgegenüber findet man im autolysierten MeOH-Extrakt auch nach 16 min noch die Elution einer Anzahl bei 345 nm (vergl. Abb.22) detektierbarer Komponenten. Wie später (III.3.7.) ersichtlich findet man bei höheren Retentionszeiten Rezeptor aktive Metabolite (vergl. Abb.32). Im vorliegenden Beispiel (Abb.20) konnte die Verschiebung der Elution verschiedener Komponenten zu höheren Retentionszeiten als Folge hydrolytischer Spaltung von Sekundärmetabolit-Glykosiden interpretiert werden. Die Konzentration von Metaboliten, welche nach etwa 12-14 min eluiert werden (Abb. 20A), nimmt ab zugunsten von Komponenten, die nach 16-19 min im Eluat detektiert werden (Abb.20B).

3.5. Isolation und Reinigung der Wirkkomponenten WK1

Da sich das Vorliegen aktiver Metabolite in glykosidisch gebundener Form bei Phaseolus radiatus Zellkulturen erwiesen hatte (III.3.4.), wurde das Gewebe in weiteren Präparationen ohne vorheriges Lyophyllisieren vor der methanolischen Extraktion autolysiert (vergl. II.5.2.). Der methanolische Auszug wurde auf ein geringes Volumen konzentriert.

Eine XAD2-Säulenchromatographie zur Vorreinigung des Extrakts hatte sich als wenig effektiv herausgestellt (vergl. Tabelle 21, III.3.3.). Da unter Verwendung von diazotierter Sulfanilsäure bei DC-Analysen die positive Reaktion (Gelbfärbung) das Vorliegen phenolischer Wirkkomponenten belegte, bot sich die Vorreinigung des Rohextrakts auf einer mit Polyamid gepackten Säule (s. II.7.2.). Polyamid kann aufgrund einer möglichen Delokalisation von π -Elektronen im (O=C-N)-Bereich eine ionische Beziehung mit phenolischen Hydroxylgruppen eingehen.

Eine definierte Menge des konzentrierten methanolischen Extrakts (20-30 ml) wurden auf einer Polyamidsäule (4,5 cm x 80 cm, 1,1 l Volumen, in H₂O äquilibriert) chromatographiert. Die Elution erfolgte zunächst mit Wasser (Abtrennung der Primärmetabolite/Fraktion P1), zur besseren Umstellung auf 100% Methanol als Elutionsmittel wurde nachfolgend 50% Methanol zur Elution verwendet (Fraktion P2). Eine schärfere Trennung einzelner Sekundärmetabolite wurde erreicht bei Elution mit 100% Methanol durch Zusatz von Ammoniak (MeOH 0,1% NH₄OH/Fraktion P3). Der Wechsel des Elutionsmittels erfolgte bei jeweils erreichter minimaler Extinktion (E_{280}) des Eluats. Der Detektion von WK1 im Eluat diente jeweils eine DC-Analyse. LM VI diente der analytischen Trennung. Die nach III.3.3. isolierten aktiven Metabolite dienten jeweils als Referenz.

Die P3-Fraktion der Polyamid-Säulenchromatographie wurde nach DC-Analyse bis zur Trockne konzentriert. Durch Lösen des Rückstands in LM VI konnte bei anschließender Kieselgel-Säulenchromatographie (4,5 cm x 70 cm, ca. 1 l Volumen, äquilibriert in LM VI) eine gute Abtrennung zahlreicher phenolischer Komponenten erreicht werden. Zur Elution diente LM VI.

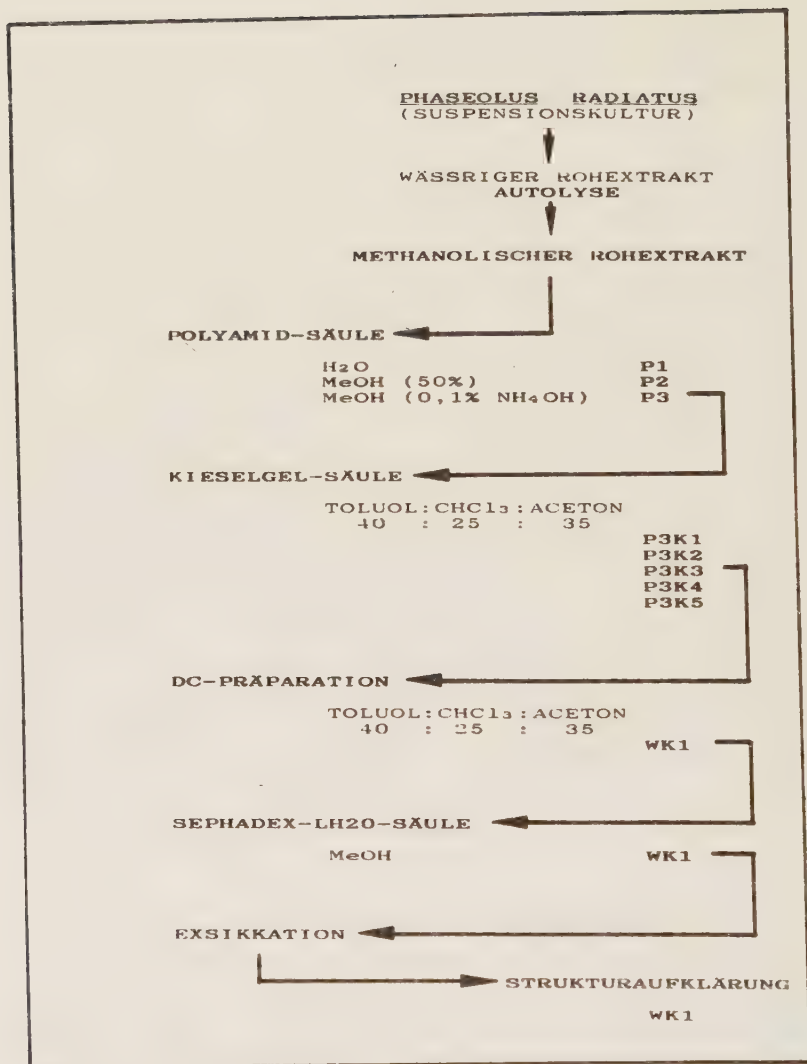


Abb. 21: Übersicht über die Isolations- und Reinigungsschritte von WK1 aus Suspensionskulturen von *Phaseolus radiatus*

Fractionen mit relativ niedrigem Grad an Verunreinigung wurden zur weiteren DC-Präparation eingeengt. Aufgrund des im Vergleich zu Verunreinigungen niedrigen Wirkstoffgehalts (hier: WK1) konnten nur durch wiederholte DC-Präparationen bei Gebrauch von LM VI ausreichende Wirkstoffmengen gereinigt werden (vergl. III.3.7.).

Eine letzte Reinigung wurde auf einer Sephadex-LH20-Säule (3,5 cm x 75 cm, ca. 0,8 l Volumen; äquilibriert in MeOH) erreicht. Die isolierte Substanz wurde nach Trocknung (Exsikkator (CaCl₂), Vakuumpumpe) zur Strukturaufklärung und Ermittlung der Benzodiazepinrezeptor-Aktivität verwendet.

Die einzelnen Schritte der Isolation und Reinigung von WK1 sind in Abb. 21 zusammengefaßt. Aus etwa 1000g Gewebe (FG) wurden 5 mg Substanz (reinst!) isoliert, das entspricht 0,05 mg/g TG. Geht man von einem Gesamtgehalt von 0,6 mg WK1 pro g Gewebe (Trockengewicht) aus (vergl. III.3.7.), dann werden nur etwa 8,3% der Substanz isoliert; pro Liter Kulturmedium wurden ca. 0,075 mg WK1 erhalten.

3.6. Strukturaufklärung der Wirkkomponenten WK1

Von der isolierten Komponenten wurde zunächst ein Massenspektrum aufgenommen (Abb. 23 A).

MS (EI) m/z (rel. Intensität %): 268 (M⁺, 100), 240 (16),
211(7), 184 (8) und 155(7)

Ein Molekulargewicht von 268 g/Mol konnte ermittelt werden. Da aufgrund der Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure (vergl. III.3.4) und eines bathochromen Shifts, welcher im

UV-Spektrum von WK1 (Abb. 22) ermittelt wurde, erste Hinweise auf das Vorliegen einer phenolischen Verbindung gegeben waren, wurde zum Nachweis acetylierbarer Gruppen (-OH-, -NH-, -NH₂-Gruppen) eine Substanzprobe in Anwesenheit von Pyridin mit Essigsäure verestert. Das aus dem Massenspektrum (Abb. 23 B) des Reaktionsprodukts ermittelte Molekulargewicht betrug 352 g/Mol. Die isolierte Komponente WK1 besaß also zwei acetylierbare Gruppen.

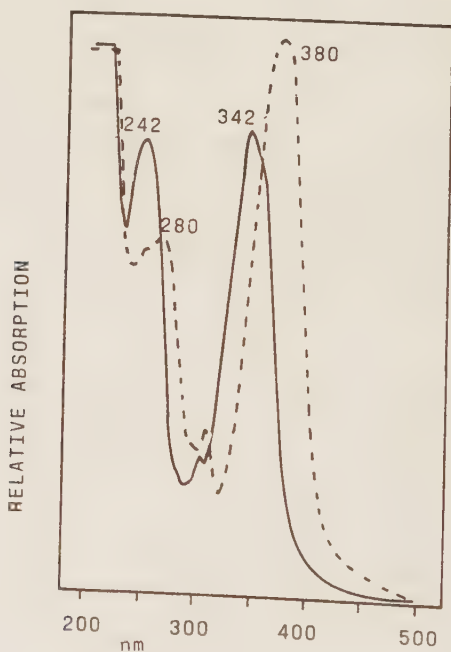


Abb. 22: UV-Spektrum von WK1 aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen in MeOH (—) und nach Zugabe von MeOH/NaOH (---). Ein bathochromer Shift der Maxima von 242 zu 280 nm und von 342 zu 380 nm wurde beobachtet.

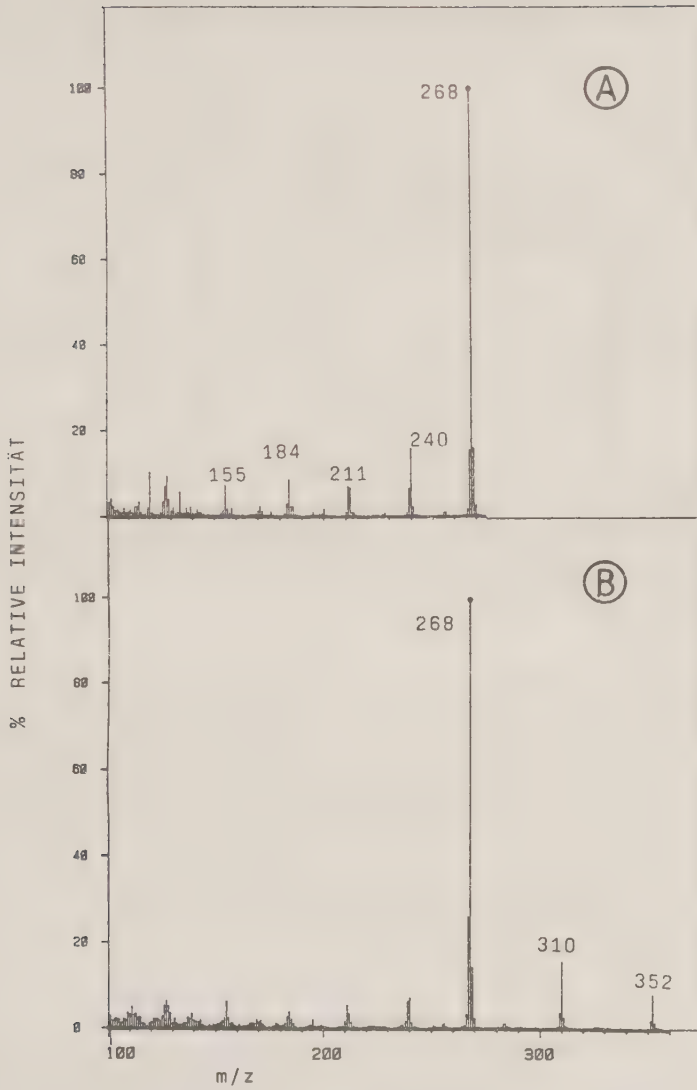


Abb. 23: Massenspektrum A: von WK1 aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen. B: der acetylierten Wirkkomponente WK1

Ein hochauflösendes Massenspektrum wurde aufgezeichnet und die Wahrscheinlichkeit möglicher Summenformeln durch Computeranalyse der Meßdaten zusammengestellt (Tabelle 27).

^{14}C	^1H	^{14}N	^{16}O
5	8	4	9
6	10	3	9
7	10	1	10
8	12	0	10
8	6	5	6
9	8	4	6
10	8	2	7
13	6	3	4
15	8	0	5
16	4	4	1
17	4	2	2
18	6	1	2

TABELLE 27: Computeranalyse eines hochauflösenden Massenspektrums einer aus Phaseolus radiatus isolierten Substanz WK1 mit der Masse 268,0351 g/mol. Als wahrscheinlich vorkommende Elemente wurden C, H, N und O angegeben; (Fettdruck s. Text unten)

Weder beim ersten Erproben von Sprühreagentien (vergl. II.7.1.) noch bei einer Elementaranalyse (Prof. Dr. Melissa, Analytische Laboratorien, Elbach) konnte ein Stickstoffnachweis erbracht werden. Nur zwei der in Tabelle 27 zusammengestellten Wahrscheinlichkeiten geben eine Summenformel wieder, bei der kein Stickstoff einbezogen ist $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_{10}$ und $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$ (Fettdruck). Erst durch NMR Spektroskopie, vor allem ^{13}C - und ^1H -NMR Spektren (s.u.) wurde die Ermittlung der Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$ möglich.

Aus der Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren konnten durch Integration acht Protonen ermittelt werden, wovon den beiden breiten mit jeweils bei 10,0 und 10,7 ppm ins Tieffeld verschobenen Signalen mit großer Wahrscheinlichkeit zwei

Hydroxylgruppen zugeordnet werden konnten. Im Aromatenbereich wurden sechs weitere Protonen ermittelt (Abb.24).

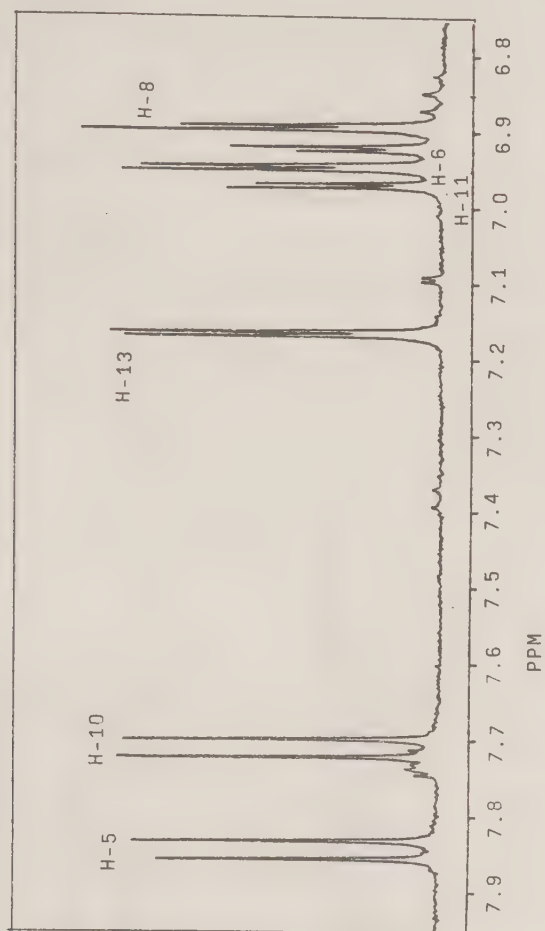


Abb. 24: ^1H -NMR-Spektrum in DMSO-D_6 von WK1 aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen

Durch Einstrahlexperimente konnten Koppelungspartner einander zugeordnet werden. Über eine große Koppelungskonstante 3J (8 Hz) koppelt H-5 mit H-6, darüberhinaus koppelt H-6 auch über eine kleine Koppelung 4J (2 Hz) mit H-8, welches am weitesten Hochfeld verschoben ist. Ähnlich ist der Fall für H-11. Hier findet man eine große Koppelung mit H-10 3J (8 Hz) und eine kleine 4J (2 Hz) mit H-13. Zur Zuordnung der Protonen vergleiche ZILG und GRISEBACH (1968).

Ein Breitband entkoppeltes ^{13}C - NMR-Spektrum ermöglichte die Ermittlung der Anzahl der Kohlenstoffatome. Im Tieffeldbereich (150-165 ppm) konnten sechs und im Bereich von 100-120 ppm neun Kohlenstoffatome beobachtet werden (Abb. 25). Die Zuordnung der einzelnen Kohlenstoffatome erfolgte durch Aufnahme von 1H - ^{13}C -Hetcor- sowie 1H - ^{13}C -long-range-Hetcor-Spektren (vergl. Abb. 28 und 29).

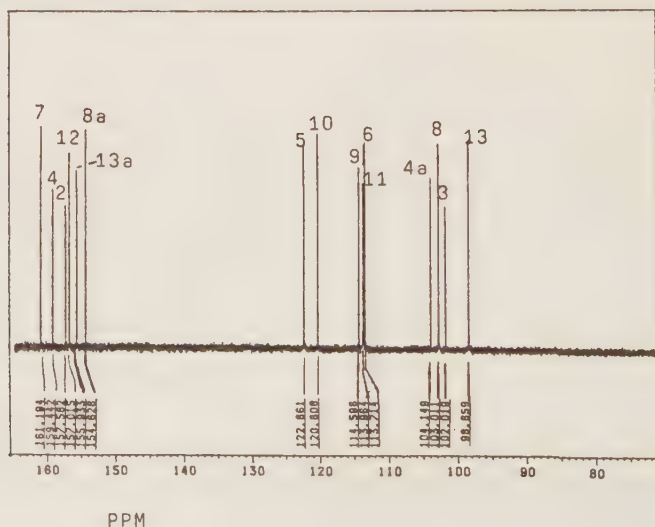


Abb. 25: Breitband entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum in DMSO- D_6 von WK1 aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen

Daten aus den ^1H -NMR- und dem Breitband entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum fanden gute Übereinstimmung mit der 7,12-Dihydroxy-6H-benzofuro [3,2-c][1]benzopyran-6-on-Struktur, dem *Coumestrol* (Abb.26).

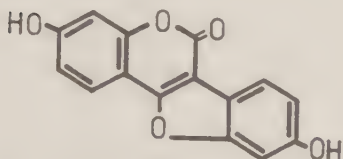


Abb. 26: Strukturformel von Coumestrol aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen

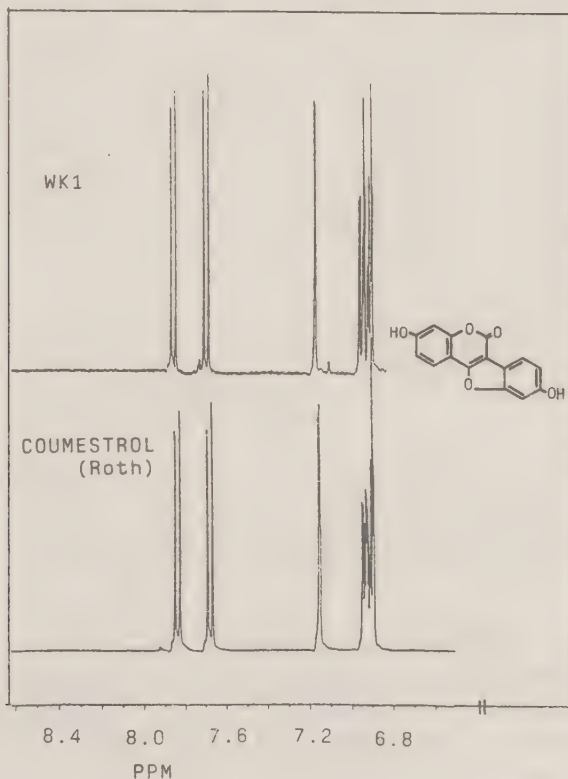


Abb. 27: Vergleichende ^1H -NMR-Spektren (Ausschnitt: Aromatenbereich) in $\text{DMSO}-d_6$ von Coumestrol (Referenz/Roth) und WK1 aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen

Es wurden vergleichende ^1H -NMR-Spektren für WK1 aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen und authentischem Coumestrol (Roth) aufgezeichnet. Aus der exakten Korrelation der Spektren beider Substanzen konnte Wk1 als Coumestrol identifiziert werden (Abb 27).

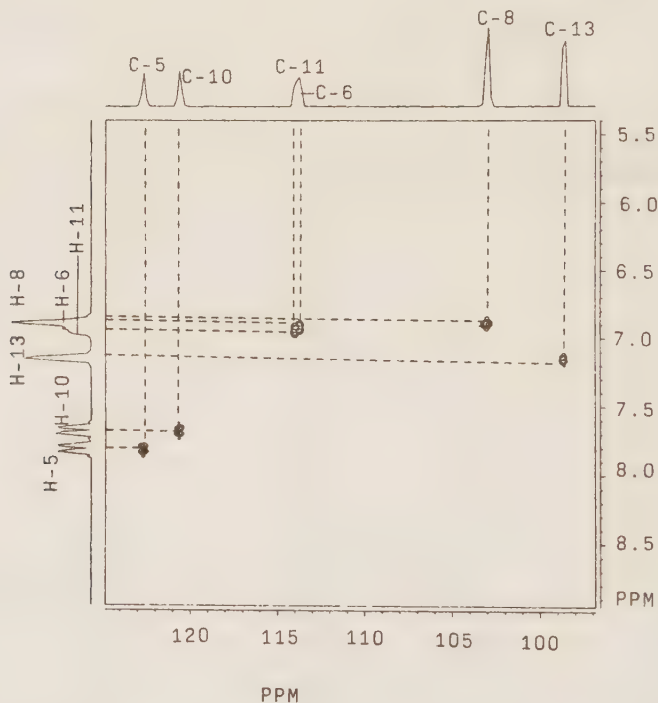


Abb. 28: ^1H - ^{13}C -Hetcor-Spektrum in $\text{DMSO}-d_6$ von Coumestrol (WK1) aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen

Eine Zuordnung der C-Atome, die direkt mit Protonen verknüpft sind, konnte in einem ^1H - ^{13}C -Hetcor-Spektrum vorgenommen werden (vergl. Abb.28): C-5 (122,7 ppm), C-6 (113,7ppm), C-8 (103 ppm), C-10 (120,6 ppm), C-11 (114,6 ppm) und C-13 (98,7 ppm).

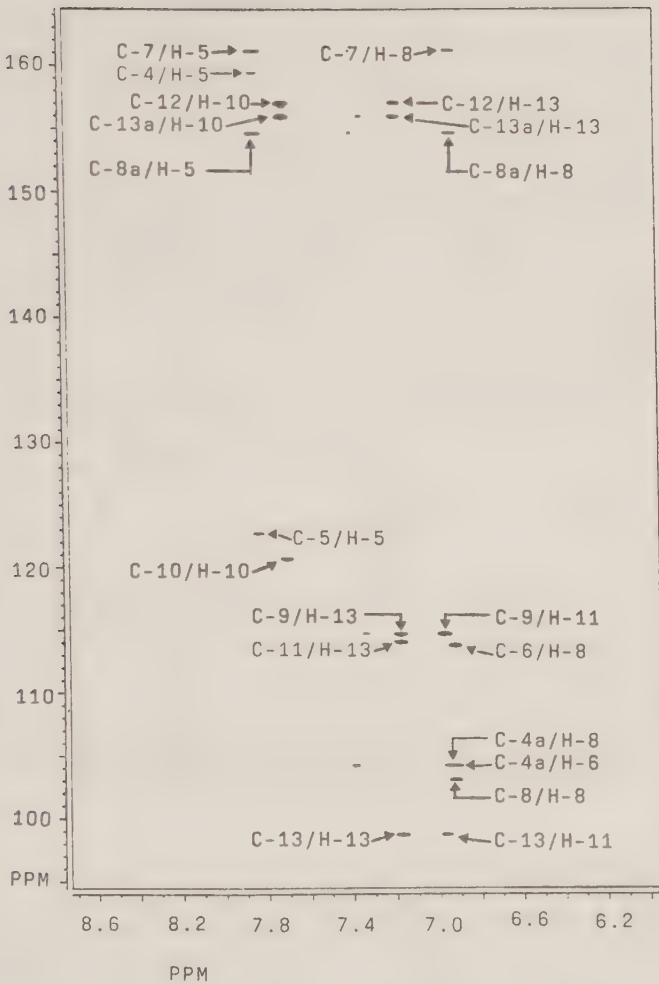


Abb. 29: ^1H - ^{13}C -long-range-Hetcor-Spektrum in $\text{DMSO}-d_6$ von Coumestrol (WK1): ^3J -Koppelungen sind am intensivsten sichtbar, ^2J -Koppelungen weniger intensiv und ^1J -Koppelungen schwach erkennbar (optimiert in einem INEPTD Experiment für quarternäre C-Atome, $J_{\text{CH}} = 10 \text{ Hz}$).

Die Zuordnung der quaternären Kohlenstoff-Atome war durch ^1H - ^{13}C -long-range-Hetcor-Spektren möglich (Abb.29): C-2 (157,5 ppm), C-3 (102 ppm), C-4 (159,4 ppm), C-4a (104,1 ppm), C-7 (161,2 ppm), C-8a (154,6 ppm), C-9 (114,6 ppm), C-12 (157 ppm) und C-13a (155,9 ppm).

Die ermittelte Strukturformel ist in Abb.30 nochmals mit der genauen Zuordnung einzelner Kohlenstoff-Atome wiedergegeben. Wie in III.3.9. noch dargelegt werden wird, ist diese Zuordnung in Hinblick der Stukturaufklärung von WK2 und WK3 äußerst bedeutsam.

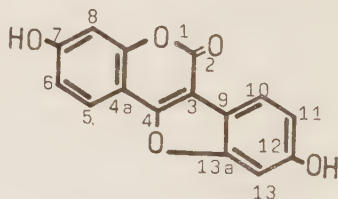


Abb. 30: Struktur von Coumestrol mit genauer Zuordnung der einzelnen C-Atome.

3.7. Versuche zur Steigerung des Wirkstoffgehalts bei Phaseolus radiatus Suspensionskulturen

Bei der Isolation von Coumestrol konnte beobachtet werden, daß die beiden anderen aktiven Metabolite WK2 und WK3 nur in angereinigten Fraktionen, nur während der Präparation detektiert werden konnten (vergl. III.3.3. sowie Tabelle 26 E342). Aufgrund des geringen Wirkstoffgehalts lag es nahe, zu versuchen, die Ausbeute der aktiven Metabolite zu steigern.

Coumestrol wird in der Literatur u.a. als ein Streßmetabolit beschrieben (BICKOFF et al., 1967; BICKOFF et al., 1969; WONG

und LATCH,1971)). Es war anzunehmen, daß es sich bei den detektierten aktiven Komponenten um Stoffe derselben Substanzklasse wie Coumestrol handelte.

Bei einer Untersuchung der einzelnen Pflanzenorgane (vergl. II.6.) von Phaseolus radiatus (vergl. II.1.1.1) wurden die aktiven Metabolite WK1 (Coumestrol) und WK2 ausschließlich in methanolischen Extrakten der Wurzel gefunden (Tabelle 28). Eine DC-Analyse zeigte gute Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Tabelle 28.

PFLANZENORGAN	WK1 [mg/g TG]	WK2 [mg/g TG]	Inhibition [%]
Wurzel	0,40	1,00	97
Stengel	0,00	0,00	0
Laubblatt	0,00	0,00	0
Blüte	0,00	0,00	0
Hülse	0,00	0,00	0
Samen	0,00	0,00	0

TABELLE 28: Vorkommen der Benzodiazepinrezeptor aktiven Komponenten WK1 und WK2 bei methanolischen Extrakten (vergl. II.6.) verschiedener Organe einer blühenden Phaseolus radiatus Pflanze (Abb.1). Der Gehalt von WK1 und WK2 wurde HPLC-analytisch bestimmt (II.7.3.). Die Verdrängung von [³H]FLU im Benzodiazepinrezeptor-Assay (in [%] Inhibition) wurde entsprechend Tabelle 4 vorgenommen.

Eine Steigerung des Wirkstoffgehalts bei Pflanzenzellkulturen durch biotische oder abiotische Agentien wird beschrieben (DIXON, 1980; DICOSMO und MISAWA, 1985; ROKEM et al.,1984). Auf dieser Grundlage wurden folgende Agentien bei Phaseolus radiatus Zellkulturen in Hinblick auf eine mögliche Steigerung des Wirkstoffgehalts zum Kulturmedium appliziert (Tabelle 29).

BIOTISCHE AGENTIEN	I	"Hefe-Elicitor"
	II	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>
ABIOTISCHE AGENTIEN	III	Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
	IV	Mangan-II-Chlorid ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)
	V	Vanadin-IV-Oxidsulfat ($\text{VOSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)
	VI	Cadmiumnitrat ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$)
	VII	Kupfersulfat (CuSO_4)

TABELLE 29: Zusatz biotischer und abiotischer Agentien zum Kulturmedium von Phaseolus radiatus Suspensionskulturen: 2,5 g Hefe/l und 200 mg "Hefe-Elicitor"/l (KOCOUREK und BALLOU, 1969) Medium wurden appliziert. Die Metallsalze wurden auf eine Konzentration von 10^{-3}M im Medium eingestellt (vergl. II.5.3.).

Vor der methanolischen Extraktion wurde eine Autolyse des Gewebes bei 37°C für 2 d durchgeführt. Die methanolische Extraktion erfolgte in einem Ultraschallbad für 3h. Eine definierte Menge Gewebe wurde in einem definierten Volumen Methanol extrahiert. Ein Aliquot des Extrakts wurde zentrifugiert (2000 Upm, RT, 2min). Eine quantitative HPLC-Analyse wurde durchgeführt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 31 wiedergegeben.

Zunächst sei vorangestellt, daß nur die aktiven Metabolite WK1 (Coumestrol) und WK2 im methanolischen Extrakt aus Suspensionskulturen von Phaseolus radiatus detektiert werden konnten. Bei allen Agentien, außer bei der Zugabe von Mangan konnte ein Anstieg des Gehalts der Wirkkomponenten beobachtet werden. Eine signifikante Zunahme an Coumestrol konnte bei Zugabe von Hefe auf mehr als das 5-fache, bei Vanadin auf das 7-fache erreicht werden. Besonders hoch waren jedoch die Ausbeuten bei Zugabe von Cadmium (VI) mit einem Faktor 19. Das Ergebnis für die zweite Wirkkomponente WK2 ist ähnlich. Während bei der Kontrolle und bei Zugabe von Mangan kein Wirkstoff detektiert werden konnte, wurde bei Zusatz

biotischer Agentien und Schwermetallsalze, der Wirkstoff detektierbar (vergl. Abb. 31). Besonders auffällig ist aber die Ausbeute bei suspendierten Zellen, die in Anwesenheit von Cadmium wachsen. Ein HPLC-Chromatogramm verifiziert im Vergleich mit der Kontrolle dieses Ergebnis (Abb. 32).

Im weiteren wurden verschiedene Konzentrationen $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ eingesetzt. In Abb. 33 ist das Ergebnis wiedergegeben.

Die Steigerung erhaltener Wirkstoffmengen ist erst bei einer Konzentration von 0,1 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ im Kulturmedium mit einem Faktor von etwa 13 signifikant. Während bis zu einer Konzentration von 0,5 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ keine Steigerung der Cd^{2+} -Wirkung verzeichnet werden kann, kommt es nochmals zu einem signifikanten Anstieg bei einer Konzentration von 10^{-3}M . Für die zweite aktive Komponente (WK2) ist das Ergebnis weniger eindrucksvoll. Hier konnte zwar wiederum in den Kontrollen kein Wirkstoff detektiert werden, doch lagen die in dieser Untersuchung erreichten Maximalwerte nur bei einem Gehalt von 0,3 mg WK2/g TG. Eine Konzentrationserhöhung der Cd^{2+} -Konzentration von 0,1 mM auf 1 mM erbrachte keine wesentliche Steigerung des WK2-Gehalts. Ein experimenteller Unterschied zum Experiment, dessen Ergebnis Abb. 31 zeigt, zur hier durchgeführten Untersuchung (Abb. 33) besteht im Zeitpunkt der Agentien-Applikation (vergl. II.5.3.).

Die Steigerung der Ausbeute von WK2 für eine Wirkstoffisolation wurde aufgrund dieser Ergebnisse möglich. Um diesen Effekt möglichst optimal für eine Isolation von WK2 ausnützen zu können, wurde eine Applikation von $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ zum Kulturmedium gewählt.

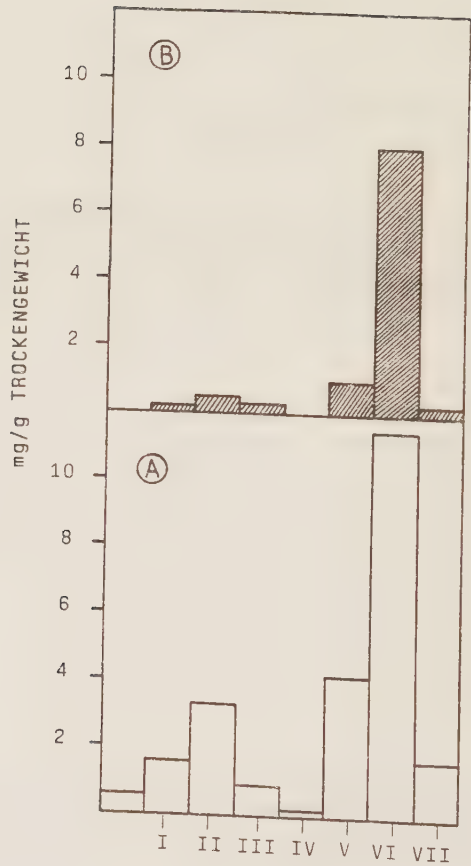


Abb. 31: Wirkung von biotischen und abiotischen Agentien auf den Gehalt an Benzodiazepinrezeptor aktiven Komponenten in methanolischen Extrakten aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen, Coumestrol(A) und WK2 (B). Zu den Bezeichnungen I-VII vergl. Tabelle 29; ohne Bezeichnung ist der Kontrollwert. Dreifachbestimmungen wurden durchgeführt; zu den Bedingungen der Zellkultivierung vergl. Tabelle 29 sowie II.5.3..

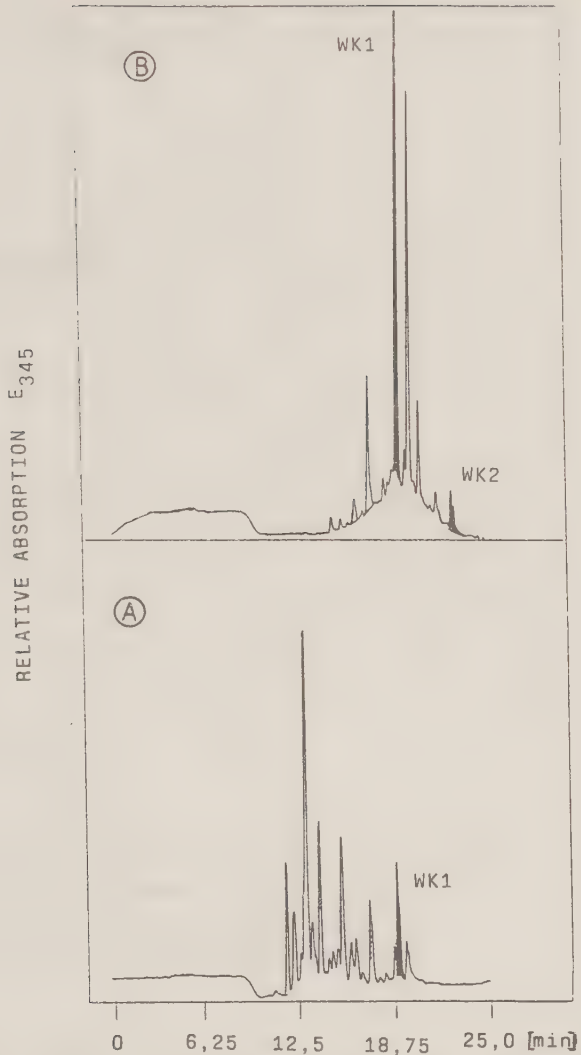


Abb. 32: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extrakts (II.5.2.) aus Suspensionskulturen von *Phaseolus radiatus* (A) bei Zusatz von $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-3}M (B) jeweils nach Autolyse des Gewebes gleich nach Abtrennen des Gewebes vom Kulturmedium (II.5.2.). Coumestrol konnte bei einer Retentionszeit von 18,9 min und WK2 nach 22,45 min eluiert werden (dunkle Kennzeichnung des jeweiligen Peak). Zu den Bedingungen der Gewebekultivierung vergl. II.5.3..

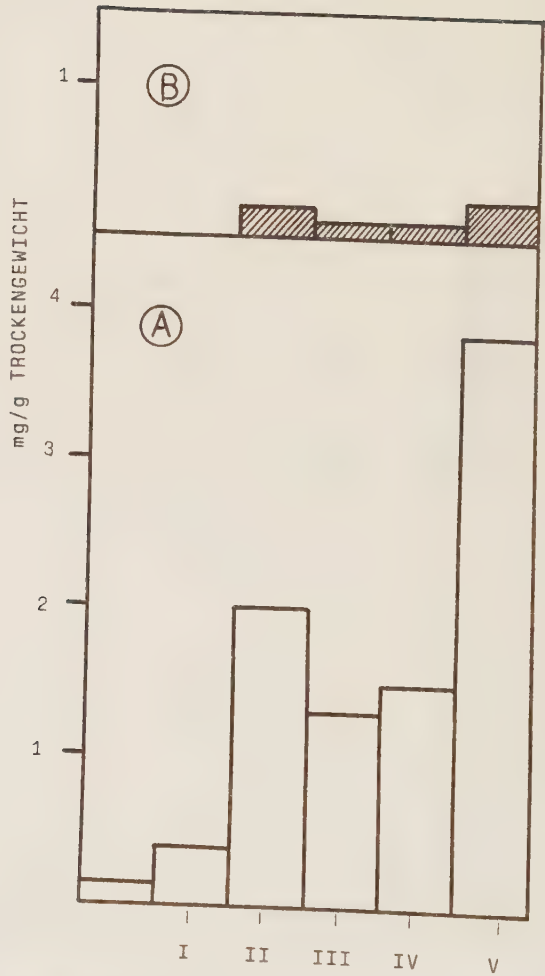


Abb. 33: Wirkung verschiedener $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -Konzentrationen (0,05 (I), 0,1 (II), 0,2 (III), 0,5 (IV) und 1 mM (V), Kontrolle ohne Bezeichnung) auf den Gehalt Benzodiazepinrezeptor aktiver Komponenten in methanolischen Extrakten (II.5.2.; vergl. Text) aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen (Kulturbedingungen vergl. II.5.3.); Coumestrol (A) und WK2 (B); jeweils Dreifachbestimmungen

3.8. Isolation und Reinigung der Wirkkomponenten WK2

Nach Zusatz von $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ in einer Konzentration von 10^{-3} M im Medium wurde das Gewebe 5 d kultiviert. Nach der Autolyse (II.5.2.) wurde ein methanolischer Auszug von einer definierten Gewebemenge hergestellt. Der konzentrierte Extrakt wurde entsprechend III.3.5. auf einer Polyamidsäule vorgereinigt, P3 nach Konzentrierung auf einer Kieselgelsäule (4,5 x 75 cm, ca. 1 l Volumen, in LM VI) chromatographiert. Dieser Reinigungsschritt wurde wiederholt. Ein erheblicher Anteil Coumestrol konnte in Methanol aus Fraktionen der Kieselgelsäulenchromatographie auskristallisiert werden. Damit wurde eine wesentlich verbesserte Abtrennung von WK2 und Coumestrol erreicht. Fraktionen der Kieselgelsäulen-Präparationen mit höchstem Reinheitsgrad konnten anschließend durch semi-präparative HPLC einem letzten Reinigungsschritt unterzogen werden. Bei dem hier verwendeten Gradienten (II.7.3.) konnte nach einer Retentionszeit von 40,3 min WK2 von Coumestrol (Retentionszeit: 32,9 min) und anderen Verunreinigungen abgetrennt werden (vergl. Abb. 34).

Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen, die Substanz getrocknet (Vakuumpumpe). Abb. 35 faßt die einzelnen Präparationsschritte zusammen. Aus 380 g Gewebe (FG) konnten 10 mg Substanz (WK2) isoliert werden, d.h. 0,26 mg WK2/g TG und ca. 0,1 mg/l Kulturmedium.

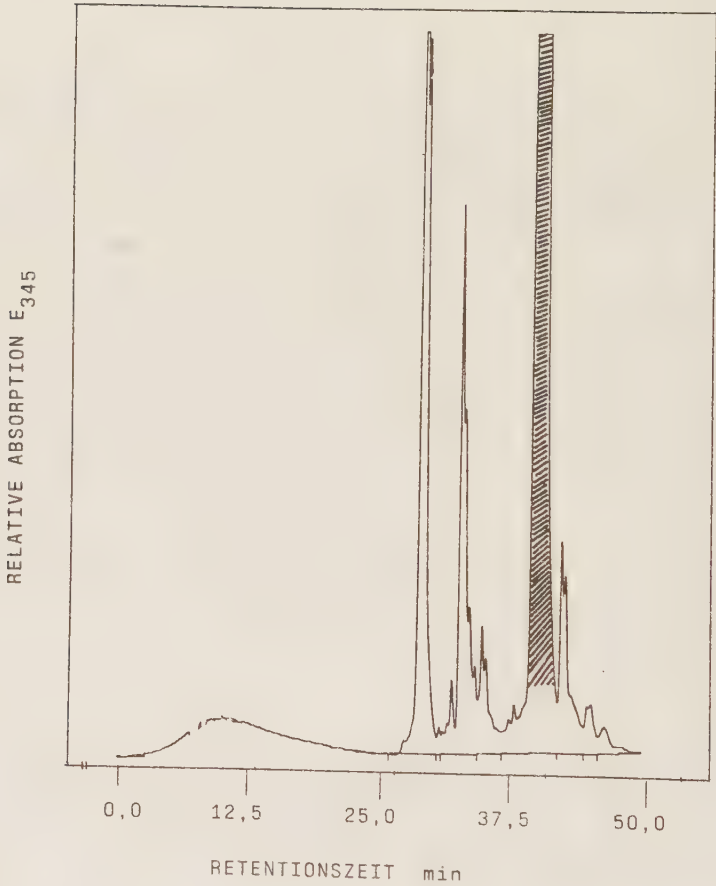


Abb. 34: HPLC-Chromatogramm einer semipräparativen HPLC vorgereinigter Fraktionen einer Wirkstoff-Präparation aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen, vergl. Text oben (III.3.8.); WK1(Coumestrol/Rt = 32,9 min) und WK2 (Rt = 40 min, Kennzeichnung: )

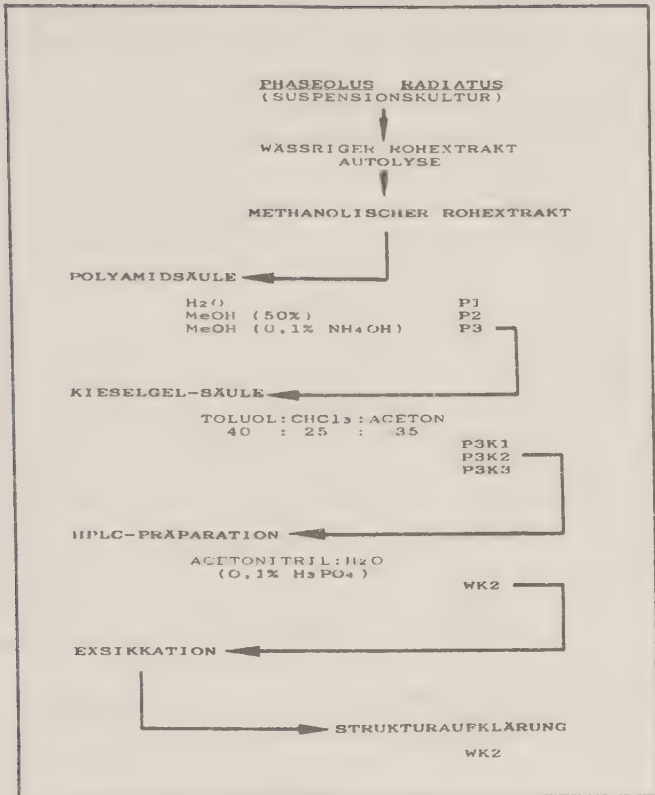


Abb. 35: Zusammenfassende Übersicht einzelner Präparationsschritte von WK2 aus Suspensionskulturen von Phaseolus radiatus

3.9. Strukturaufklärung der Wirkkomponenten WK2 und WK3

Durch Aufnahme eines Massenspektrums (EI) konnte für WK2 folgende Fragmentierung beobachtet werden (vergl. Abb. 36).

MS (EI) m/z (rel. Intensität %): 336 (M^+ , 35), 281 (80) $M^+ - C_4H_7$, 280 (100) $M^+ - C_4H_8$, 253 (5), 252 (11)

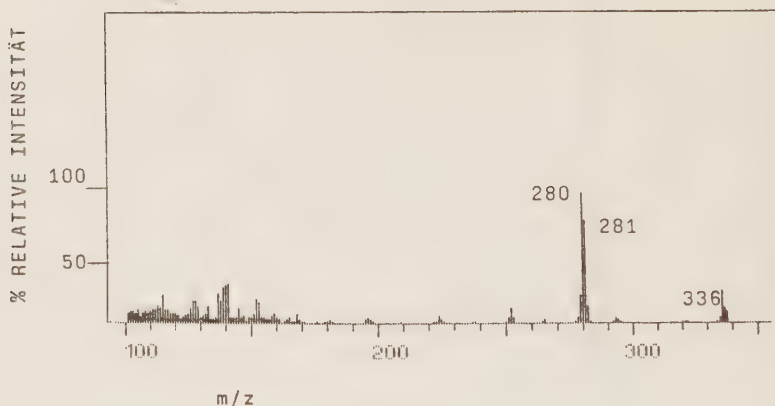


Abb. 36: Massenspektrum (EI) von WK2 aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen

Zur Strukturaufklärung der aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen isolierten Substanz WK2 dienen 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren. Ein 1H -NMR-Spektrum von WK2 wurde in Aceton- D_6 aufgenommen: δ 1,68 (3H, s, Me), δ 1,92 (3H, s, Me), δ 3,69 (2H, d, 7,4 Hz, H-1'), δ 5,45 (1H, brt, H-2'), δ 6,96 (1H, d, 2,1 Hz, H-8), δ 7,03 (1H, dd, 8,5 Hz, 2,1 Hz, H-6), δ 7,06 (1H, d, 8,3 Hz, H-11), δ 7,61 (1H, d, 8,3 Hz, H-5). Die Signale im Aromatenbereich geben erste Hinweise für eine

Coumestan-Struktur, die gleiche Grundstruktur für WK2 wie für Coumestrol. Aufgrund des Gebrauchs von Aceton-D₆ wurde eine leichte Verschiebung der Resonanzen gegenüber jenen, die für Coumestrol ermittelt wurden (vergl. Abb. 24), detektiert. Die Signale im Hochfeldbereich (1,5-5,5 ppm) deuten auf einen γ , δ -Dimethyl-allyl-Substituenten. Aus ¹³C-NMR-Spektren konnten 20 Kohlenstoffatome ermittelt werden. Bei 17,96 und 23,55 ppm war jeweils eine -CH₃-Gruppe und bei 25,92 ppm eine -CH₂-Gruppierung zu erkennen. Dies bestätigt das Ergebnis des Protonenspektrums, welches das Vorliegen eines Prenylrestes zeigt.

Aus Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren von WK2 und Coumestrol konnte die Position des γ , δ -Dimethyl-allyl-Substituenten mit großer Wahrscheinlichkeit der Position C-13 zugeordnet werden. Im ¹³C-NMR-Spektrum von WK2 konnte C-13 nicht mehr in demselben Bereich wie für Coumestrol detektiert werden, sondern Tieffeld verschoben. Die genaue Position - C-8 oder C-13 - des Prenylrestes war zu bestimmen (vergl. Abb. 37). Die eindeutige Zuordnung der Kohlenstoff-Atome (III.3.6) der Coumestanstruktur war hier unbedingte Voraussetzung.

Die Aufnahme von long-range- ¹H-¹H-Cosy-Spektren für WK2 läßt deutlich die Fernkopplungen ⁵J_{H11-H1'} und ⁶J_{H10-H1'} (Abb. 37) erkennen, welche eindeutig (!) bestätigen, daß sich der Prenylrest bei WK2 in Position C-13 befindet.

Die Struktur des prenylierten Coumestans gibt Abb. 38 wieder. In Übereinstimmung mit O'NEILL et al. (1984) konnte WK2 als *Isosojagol* identifiziert werden.

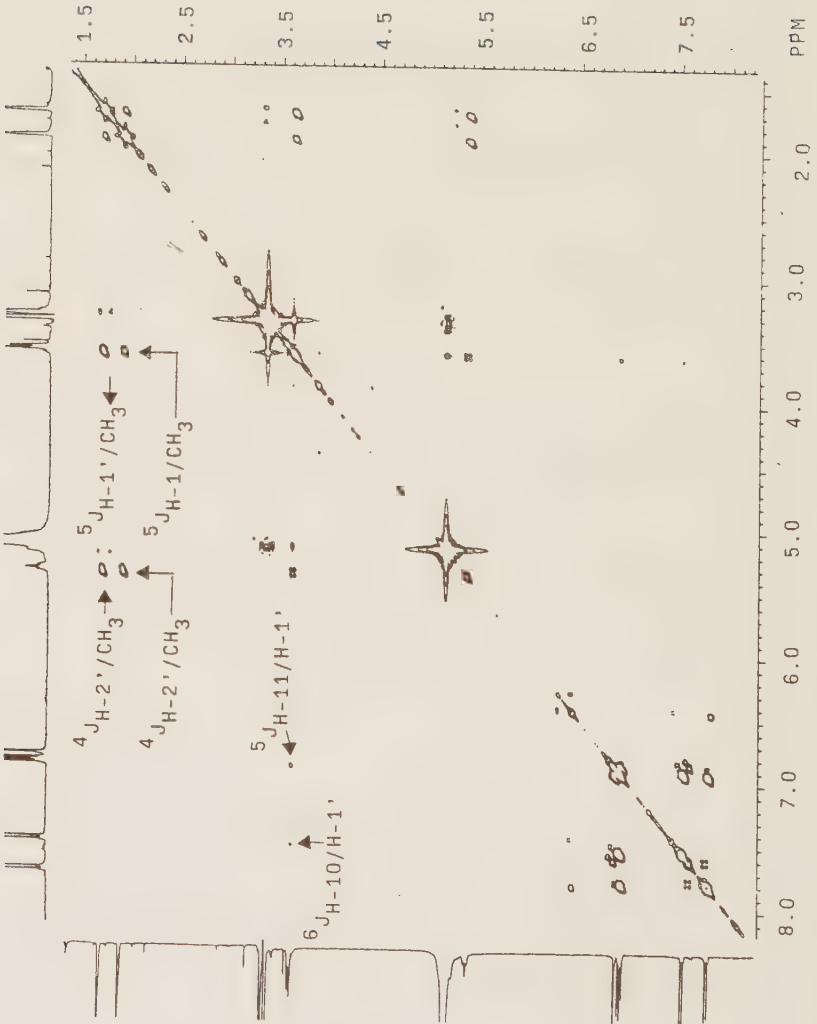


Abb. 37: 2D-long-range- ^1H - ^1H -Cosy-Spektrum von WK2 aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen in CD_3OD

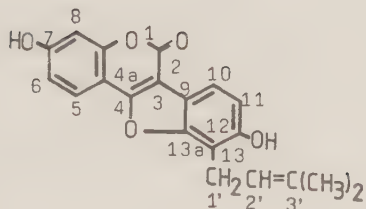


Abb. 38: Strukturformel von Isosojagol(=WK2) aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen.

Zur Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren in verschiedenen Lösungsmitteln wurden jeweils die Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Bei einer solchen Konzentrierung einer methanolischen Lösung von WK2 konnte in nachfolgenden spektroskopischen Messungen nur noch eine mit WK3 identische Substanz nachgewiesen werden.

Bei Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums in Aceton- D_6 konnten für WK3 folgende Daten ermittelt werden: δ 1,39 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), δ 1,96 (2H, t, H-2'), δ 3,08 (2H, t, H-1'), δ 6,88 (1H, d, 8,5 Hz, H-11), δ 6,96 (1H, d, 2,0 Hz, H-8), δ 7,01 (1H, dd, 8,5 Hz, 2,0 Hz, H-6), δ 7,66 (1H, d, 8,5 Hz, H-10), δ 7,9 (1H, d, 8,5 Hz, H-5). Wiederum sind zwei Methylgruppen erkennbar. Eine Prenylstruktur konnte nicht gezeigt werden, sondern nur noch zwei Methylengruppen bei 1,96 und 3,08 ppm.

Die Position des Dimethylpyran-Rings bei WK3 wurde bestätigt durch long-range- ^1H - ^1H -Cosy-Spektren mit $^5\text{J}_{\text{H}11-\text{H}1'}$ und $^6\text{J}_{\text{H}10-\text{H}1'}$ (Abb. 39).

Die für WK3 ermittelte Strukturformel ist in Abb. 40 wiedergegeben. In Übereinstimmung mit ZILG und GRISEBACH (1968) konnte WK3 als *Sojagol* identifiziert werden.

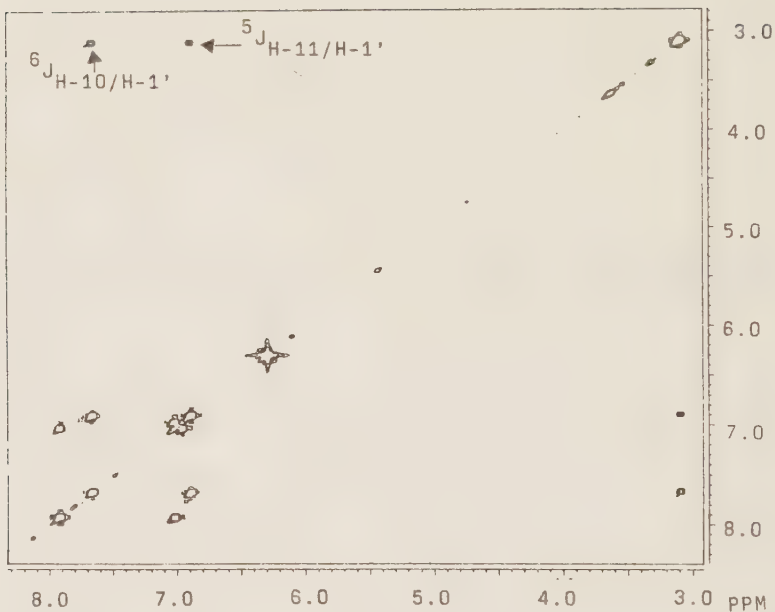


Abb. 39: 2D-long-range- ^1H - ^1H -NMR-Cosy-Spektrum von WK3 in Aceton- D_6

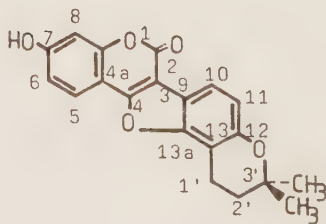


Abb. 40: Strukturformel von Sojagol (=WK3)

Sojagol zeigte ein mit WK2 nahezu identisches Massenspektrum:

MS (EI) mit m/z (rel. Intensität %): 336 (M^+ , 35), 280 (100), 252 (8), 224 (6), 196 (17).

Mit 336 g/Mol besitzt Sojagol nicht nur dieselbe Masse wie Isosojagol, sondern ebenso die Summenformel $C_{20}H_{16}O_5$. Die Protonenspektren beider Substanzen zeigen aber eindeutig zwei unterschiedliche Strukturen. Isosojagol zyklisiert spontan zum Sojagol, welches im methanolischen Rohextrakt nie detektiert werden konnte.

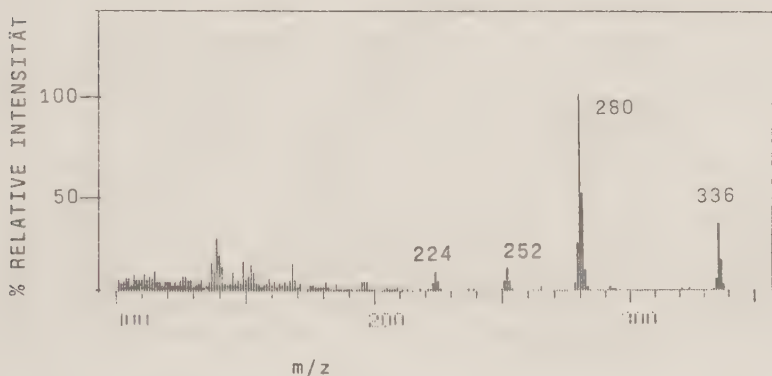


Abb. 41: Massenspektrum (EI) von WK3 (Sojagol)

3.10. Benzodiazepinrezeptor-Aktivität aus Phaseolus radiatus isolierter Coumestane

Die aus Phaseolus radiatus isolierten Coumestane Coumestrol, Isosojagol und Sojagol wurden im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay verwendet und ihre Affinität zum Rezeptor ermit-

telt. Für Sojagol konnte mit 31% Inhibition der Radioligand-Bindung bei einer Konzentration von $10^{-4}M$ im Bindungsassay nur eine geringe Rezeptoraffinität beobachtet werden. (vergl. Tabelle 26), bei einer Konzentration von $3 \times 10^{-5}M$ nur noch 5% Hemmung. Demgegenüber besitzen die beiden anderen isolierten Coumestane eine signifikante Affinität zum Benzodiazepinrezeptor (Abb. 42). Wie bereits in Abb. 42 ersichtlich verstärkt die Prenylierung des Coumestans in Position 13 seine Affinität zum Rezeptor. Eine genauere Auskunft über die Wirkungsstärke der beiden Coumestane hinsichtlich ihrer Radioligand-Verdrängung gibt Tabelle 30.

LIGAND	IC ₅₀ [M]
Clonazepam	$1,9 \times 10^{-9}$
Isosojagol	$1,3 \times 10^{-7}$
Coumestrol	$4,1 \times 10^{-7}$

TABELLE 30: Verdrängung der spezifischen [3H]FLU-Bindung durch Clonazepam als Kontrollwert und Coumestan-Derivate aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen. Die Ermittlung der IC₅₀-Werte wurde mit 6-8 verschiedenen Konzentrationen durch eine logit-log-Linearisierung vorgenommen; jeweils drei Einzelbestimmungen (Inkubationsbedingungen Tabelle 4) wurden durchgeführt.

Der Bereich der Benzodiazepinrezeptor-Aktivität von Isosojagol und Coumestrol sowie Clonazepam als synthetische Standard-Verbindung ist vergleichbar mit der Opiatrezeptor-Aktivität von Morphin als pflanzlichem Sekundärmetabolit und dem synthetischen Verdränger Diprenorphin (vergl. Tabelle 17). Durch die Prenylierung in Position 13 beim Isosojagol konnte die prozentuale Hemmung der spezifischen Radioligand-Bindung mehr als verdoppelt werden. Die logit-log-Analyse ist in Abb. 43 dargestellt.

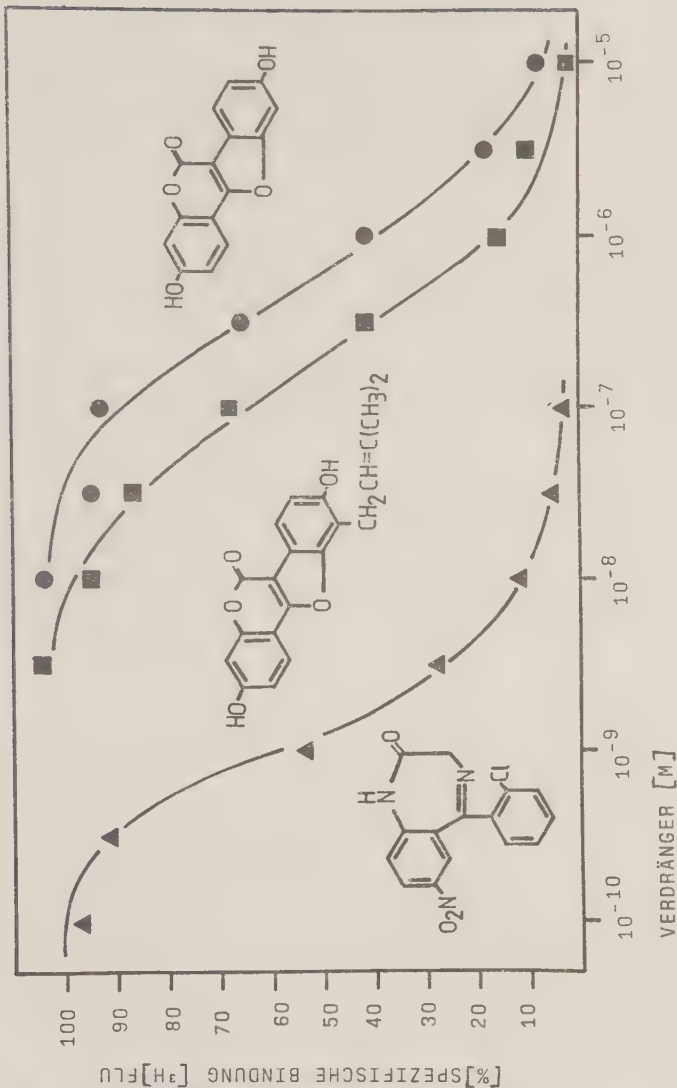


Abb. 42: Verdrängung spezifisch gebundenen $[^3\text{H}]$ FLU durch Clonazepam (▲) und den Coumestanen Isosojagol (■) und Coumestrol (●) aus *Phaseolus radiatus* Suspensionskulturen im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay; Werte der sigmoidalen Hemmkurve jeweils aus Mittelwerten von Dreifachbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4)

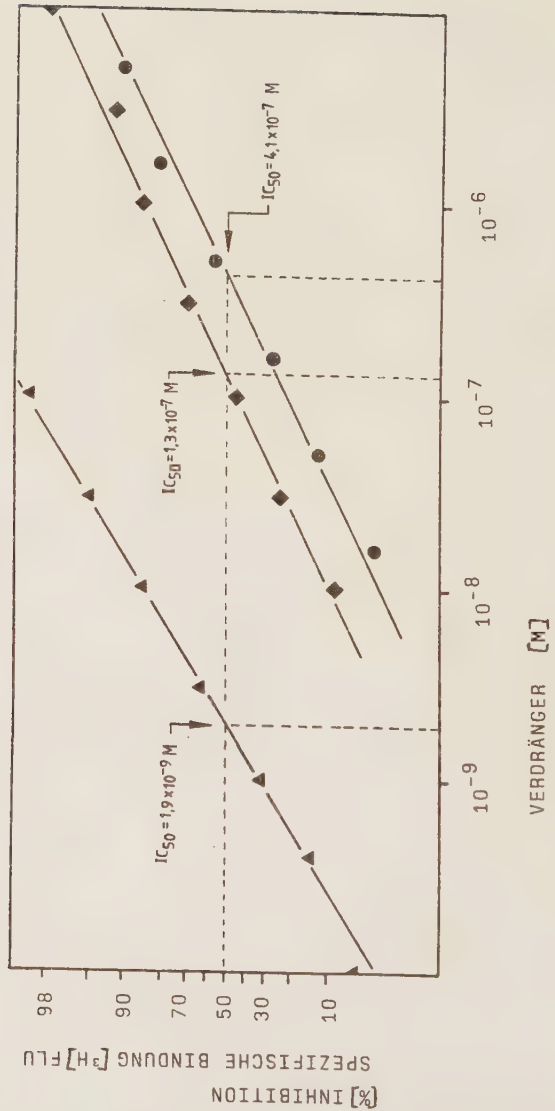


Abb. 43: logit-log-Plot für die Verdrängung spezifisch gebundenen $[^3\text{H}]$ FLU durch Clonazepam ($\blacktriangle$), Isosojagol ($\blacksquare$) und Coumestrol ($\bullet$) im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay; Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4).

4. UNTERSUCHUNGEN ZU STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN AN ÖSTROGEN- UND BENZODIAZEPINREZEPTOREN VON COUMESTANEN, PTEROCARPANEN UND ISOFLAVONEN

Die Coumestane (Abb. 44) bilden eine Klasse von Verbindungen, welche neben z.B. Pterocarpanen und Isoflavonen zur Gruppe der Isoflavonoide zählt (WONG, 1975). Man kennt heute mehr als 30 natürlich vorkommende Vertreter der Coumestane (HARBORNE et al., 1975; BICKOFF et al., 1969; WONG, 1970; INGHAM, 1983).

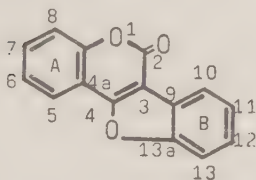


ABB. 44: Coumestan-Struktur

Coumestrol, welches hier als Benzodiazepinrezeptor aktives Prinzip aus Phaseolus radiatus isoliert werden konnte, wurde erstmals aufgrund seiner leicht östrogenen Aktivität bei Trifolium repens (BICKHOFF et al., 1958) und Medicago sativa (GUGGOLZ et al., 1961) entdeckt. Diese biologische Eigenschaft zeigten darüberhinaus einige Isoflavone (BIGGERS, 1959). Entsprechende Östrogenrezeptor-Bindungsstudien für Coumestrol und andere Phytoöstrogene wurden inzwischen durchgeführt (LEE et al., 1977; NELSON et al., 1984; NEWSOME und KITTS, 1977, 1980).

Die vorliegende Studie versucht einmal, Strukturmerkmale Benzodiazepinrezeptor aktiver Coumestane und darüberhinaus

weiterer Isoflavonoide zu ermitteln; zum zweiten die Frage einer möglichen positiven oder auch negativen Korrelation der Rezeptoraktivitäten im Benzodiazepin-Bindungsassay und Östrogen-Bindungsassay in Abhängigkeit spezifischer Strukturmerkmale zu klären. Die Ergebnisse der gesamten Untersuchung sind tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle 31), Die Ermittlung der IC_{50} -Werte erfolgte jeweils nach der logit-log-Analyse.

4.1. Struktur und Affinität von Coumestanen

Es wurden zunächst 9 verschiedene Coumestanderivate im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay untersucht (vergl. Tabelle 31). Es konnte eine Abhängigkeit zwischen Hydroxylierungsgrad und Affinität sowie Position der Hydroxylierung und Wirkungsstärke ermittelt werden.

Von allen untersuchten Derivaten war Isosojagol mit einer IC_{50} von $1,3 \times 10^{-7}$ M das aktivste. Wie bereits erwähnt (III.3.10) scheint die Prenylierung der Position 13 sich günstig auf die Affinität zum Membranrezeptor auszuwirken. Ebenfalls stärker wirksam als Coumestrol ist das vierfach hydroxylierte Demethyl-Wedelolacton (Tabelle 31) mit einem IC_{50} -Wert von 2×10^{-7} M, während das dreifach hydroxylierte Demethyl-5-Dehydroxy-Wedelolacton mit einer IC_{50} von $3,9 \times 10^{-7}$ M etwa die gleiche Affinität wie Coumestrol ($IC_{50} = 4,1 \times 10^{-7}$ M) zum Benzodiazepinrezeptor besitzt. Das Ergebnis belegt, daß eine ortho-Hydroxylierung in den Positionen 11 und 12 des B-Rings keinen Einfluß auf die Benzodiazepinrezeptor-Aktivität zeigt, während die meta-Hydroxylierung des A-Rings in Position 5 eine leichte Wirkungsverstärkung bringt.

Alle bisher genannten Coumestanderivate sind etwa in demselben Konzentrationsbereich wirksam (Abb. 45 A). Diese Situation ändert sich bei Methylierung oder Ausbildung eines Ethoxy-Derivats (Abb. 45 B) in Position 7, wie z.B. beim Wedelolacton mit einer IC_{50} von $1,6 \times 10^{-6} M$, beim 5-Dehydroxy-Wedelolacton ($IC_{50} = 2,8 \times 10^{-5} M$). Unter Beibehalt der Hydroxylierung in Position 5 wirkt sich die Ethoxygruppierung in Position 7 weniger stark auf das Bindungsverhalten aus ($IC_{50} = 9,6 \times 10^{-6} M$) als eine Methoxylierung in dieser Position beim 5-Dehydroxy-Wedelolacton, möglicherweise aufgrund der freien Hydroxylgruppe in Position 5.

Ist eine freie Hydroxylgruppe am Ring A nicht gegeben, wie z.B. beim 5-Methyl-Wedelolacton, bei welchem nur 23% Inhibition der [3H]FLU-Bindung in einer Konzentration von $10^{-4} M$ ermittelt werden konnte, nimmt die Affinität zum Benzodiazepinrezeptor merklich ab. Ähnlich ist der Fall bei Ausbildung eines Dimethylpyranrings durch O-Alkylierung der Hydroxylgruppe in Position 12. Hier konnte bei Umwandlung von Isosojagol in Sojagol nur noch eine geringe Rezeptor-Affinität von etwa 30% Hemmung der Radioligand-Bindung in einer Konzentration von $10^{-4} M$ ermittelt werden (vergl. III.3.10).

Darüberhinaus wurde bei vollständig methylierten oder acetylierten Derivaten keine Aktivität im Rezeptor-Bindungsassay ermittelt, woraus man schließen kann, daß für eine Rezeptor-Ligand-Interaktion Hydroxylgruppen erforderlich sind.

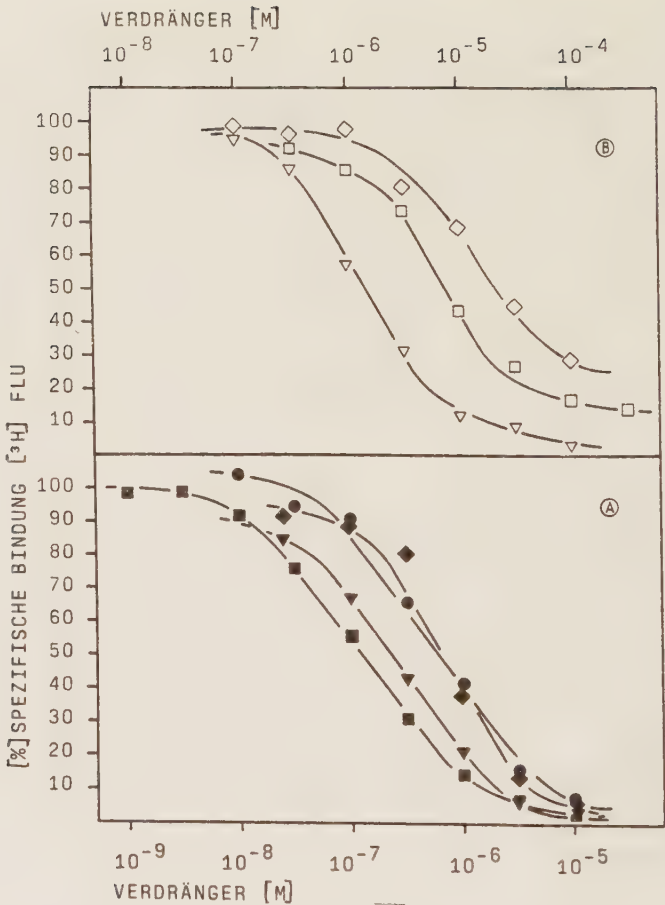


Abb. 45: Verdrängung der spezifischen Bindung von [3H]FLU durch verschiedene Coumestanderivate im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4). Werte der sigmoidalen Hemmkurven jeweils aus Dreifachbestimmungen ermittelt. A: Isosojagol (■), Demethylwedelolacton (▼), Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton (◆), Coumestrol (●); B: Wedelolacton (▽), 5-Dehydroxy-Wedelolacton (◇) und Demethyl-7-ethyl-Wedelolacton (□). Vergl. Tabelle 31

Im Östrogenrezeptortest sind wesentlich weniger untersuchte Coumestanderivate aktiv (vergl. Tabelle 31; Abb. 46). Die höchste Affinität zum Östrogenrezeptor zeigte Coumestrol mit einer IC_{50} von $1,3 \times 10^{-8} M$. Das prenylierte Isosojagol ($IC_{50} = 1,8 \times 10^{-7} M$) war um etwa eine Zehnerpotenz weniger aktiv. Die ortho-Hydroxylierung in den Positionen 11 und 12 führte zu einer erheblichen Abnahme der Verdrängungsrate. Für Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton konnte nur eine IC_{50} von $8 \times 10^{-6} M$ ermittelt werden. Die meta-Hydroxylierung in Position 5 am Ring A erbrachte einen weiteren Wirkungsverlust; für Demethyl-Wedelolacton konnten nur noch 40% Inhibition der Radioligand-Bindung in einer Konzentration von $10^{-4} M$ ermittelt werden. Die Methylierungen und Ethyloxid-Bildung am Ring A führten zu einem Wirkungsverlust, der ganz deutlich für Wedelolacton ist (Tabelle 31).

Etwas anders macht sich die Substitution am Ring B im Östrogen-Bindungsassay bemerkbar. Für Sojagol konnte in einer Konzentration von $10^{-4} M$ eine Inhibition der $[^3H]$ -Östradiol-Bindung von 57% ermittelt werden.

Interessant ist der Vergleich der Rezeptoraktivitäten in beiden rezeptorologischen Studien (Abb. 47) für Coumestrol, Isosojagol und Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton. Während Coumestrol hier etwas stärker östrogen aktiv ist, kommt es beim Isosojagol zu einer guten Korrelation von Östrogenrezeptor- und Benzodiazepinrezeptor-Affinität. Die Prenylierung in Position 13 führt einmal zu einer stärkeren Affinität zum Membranrezeptor im Vergleich zu Coumestrol, andererseits zu einer geringeren zum Östrogenrezeptor wiederum relativ zu Coumestrol. Die ortho-Hydroxylierung beim Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton zeigt eine Wirkungsminderung in beiden Testsystemen; diese ist beim Östrogenrezeptor stärker ausgeprägt.

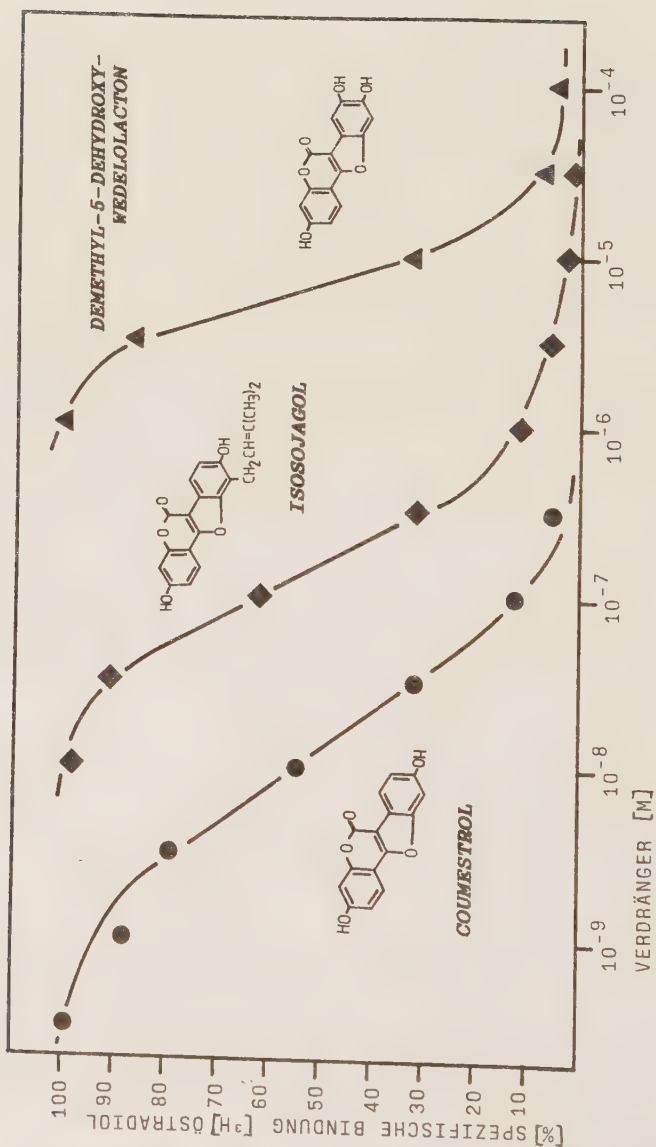


Abb. 46: Verdrängung der spezifischen Bindung von [³H]Östradiol durch verschiedene Coumestane im Östrogenrezeptor-Bindungsassay (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 5). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt für Coumestrol (•), für Isosojagol (■) und Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton (▲). Vergl. Tabelle 31.

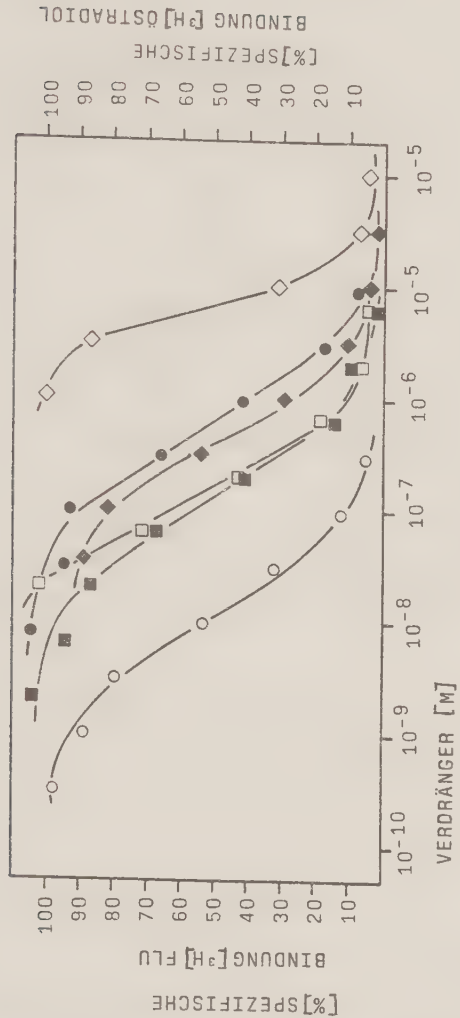


Abb. 47: Verdrängung von $[^3\text{H}]$ -FLU im Rezeptorbindungsassay durch Coumestrol (●), Isosojagol (■) und Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton (◆); von $[^3\text{H}]$ -Östradiol durch Coumestrol (○), Isosojagol (□) und Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton (◇); jeweils Dreifachbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4 und 5). Vergl. Tabelle 31

4.2. Struktur und Affinität von Pterocarpanen

Die Pterocarpan-Grundstruktur ist in Abb. 48 wiedergegeben. Leider waren keine Derivate zugänglich, welche in der Substitution mit den in III.4.1. untersuchten Coumestanen übereinstimmten.

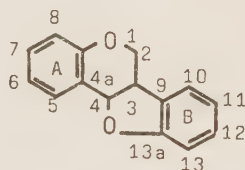


Abb. 48: Pterocarpan-Struktur

Neben Pterocarpin und (-) Maackiain stand Medicarpin sowohl als Racemat als auch die linksdrehende Konfiguration der Verbindung zur Verfügung für Untersuchungen im Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor-Bindungsassay (vergl. Tabelle 31).

Nur für das Racemat (+/-) Medicarpin konnte eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve im Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor-Bindungsassay ermittelt werden (Abb. 49). Die Werte halbmaximaler Inhibition der spezifischen Radioligand-Bindung sind mit jeweils $1,4 \times 10^{-4}$ M für $[^3\text{H}]\text{FLU}$ und 8×10^{-5} M für $[^3\text{H}]17\beta\text{-Östradiol}$ ziemlich hoch und deuten auf eine geringe Affinität des Pterocarpan zum jeweiligen Rezeptor. Ob diese geringe Rezeptor-Affinität auf die Methoxygruppe in Position 12 zurückzuführen ist, oder die Pterocarpan-Struktur per se geringere Rezeptoraktivitäten relativ zu Coumestanen besitzt, kann durch das Ergebnis nicht belegt werden. Im Unterschied zum Racemat weist (-)Medicarpin sowohl beim Membranrezeptor wie Östrogenrezeptor

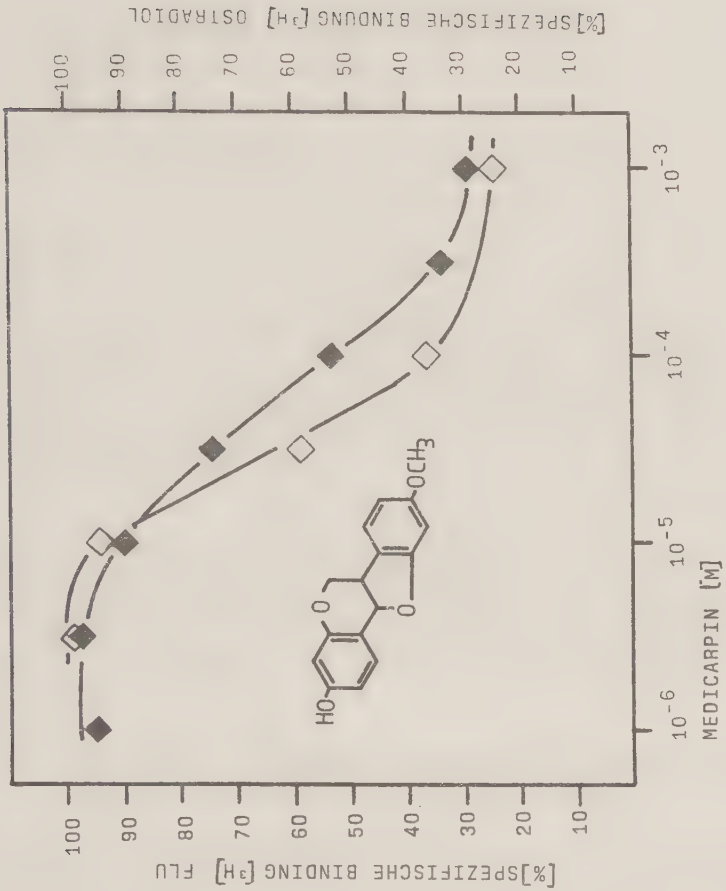


Abb. 49: Verdrängung von [³H]FLU(◆) und [³H]Östradiol(◇) im Rezeptorbindungsassay (sigmoidale Hemmkurve) durch (+/-)Medicarpin; jeweils Dreifachbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4 und 5). Vergl. Tabelle 31

tor nur eine Hemmung von 43% in einer Konzentration von 10^{-3}M auf. Dies gibt Hinweis auf eine mögliche Bedeutung der D- und L-Konfiguration in Position 7 hydroxylierter Isoflavonoide für die Bindung am Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor.

Die Ausbildung einer Methylenbrücke am Ring B führt beim (-) Maackiain besonders beim Benzodiazepinrezeptor mit nur 11% Inhibition der [^3H]FLU-Bindung in einer Konzentration von $3 \times 10^{-4}\text{M}$ zu einem erheblichen Verlust der Aktivität. Auf das Bindungsverhalten am Östrogenrezeptor hat die Ausbildung des Heterozyklus nur wenig Einfluß ($\text{IC}_{50} = 1,8 \times 10^{-4}\text{M}$) im Vergleich mit (+/-)Medicarpin (vergl. Tabelle 31). Auch beim (-)Maackiain scheint das linksdrehende Derivat möglicherweise das im Benzodiazepinrezeptor-Assay weniger aktive, da beim methylierten Pterocarpin eine etwas höhere Aktivität in einer Konzentration von 10^{-4}M mit 40% Inhibition der [^3H]FLU-Bindung erreicht werden konnte. Die Methoxygruppe des Pterocarpins bewirkt demgegenüber im Östrogenrezeptor-Bindungsassay im Vergleich mit (-) Maackiain eine erheblich geringere Inhibition (nur 11%) der Radioligand-Bindung in hoher Konzentration (10^{-3}M).

4.3. Struktur und Affinität östrogenen Isoflavone

Zu den leicht östrogenen Isoflavonen (WONG, 1975) gehören vor allem Formononetin, Genistein, Biochanin A, Daidzein und Pratensein (WONG, 1975; SACHSE, 1974). Tabelle 31 gibt u.a. Auskunft über die Aktivität untersuchter Isoflavone (Struktur Abb. 50) im Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor-Bindungsassay. Darüberhinaus wurden Prunetin, das Coumaronochromon-Derivat Lupinalbin A und das Flavon Apigenin in beiden Rezeptor-Bindungsstudien untersucht.

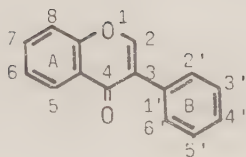


Abb. 50: Isoflavon-Struktur

Von den östrogenen Isoflavonen konnte nur für Daidzein eine Dosis-Wirkungs-Beziehung am Benzodiazepinrezeptor ermittelt werden mit einer IC_{50} von $3 \times 10^{-5} M$ (Abb.51). Auch das 7-O-Glukosid Daidzin wurde verwendet; die Glukosidierung ergab einen völligen Wirkungsverlust.

Interessant ist die Aktivität von Genistein im Benzodiazepinrezeptor-Assay. Die meta-Hydroxylierung von Ring A in den Positionen 5 und 7 führt zu einer Abnahme der Inhibition der Radioligand-Bindung zu nur 40% bei einer Genistein-Konzentration von $10^{-4} M$.

Der Wirkungsverlust im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay im Vergleich mit Daidzein ist noch stärker ausgeprägt bei den methylierten Phytoöstrogenen Pratensein mit 31%, Formononetin mit 23% und Biochanin A mit nur 15% Inhibition jeweils beim Vorliegen einer Konzentration von $10^{-4} M$. Ebenso wenig aktiv ist das Coumaronochromon Lupinalbin A (27% Inhibition bei einer Konzentration von $10^{-4} M$), wahrscheinlich wiederum aufgrund der meta-Hydroxylierung am Ring A (vergl. Genistein und Biochanin A). Die Methylierung der Hydroxylgruppe in Position 7 beim Prunetin bewirkt ähnlich wie die Glukosidierung des Daidzein einen völligen Verlust der Benzodiazepinrezeptor-Aktivität.

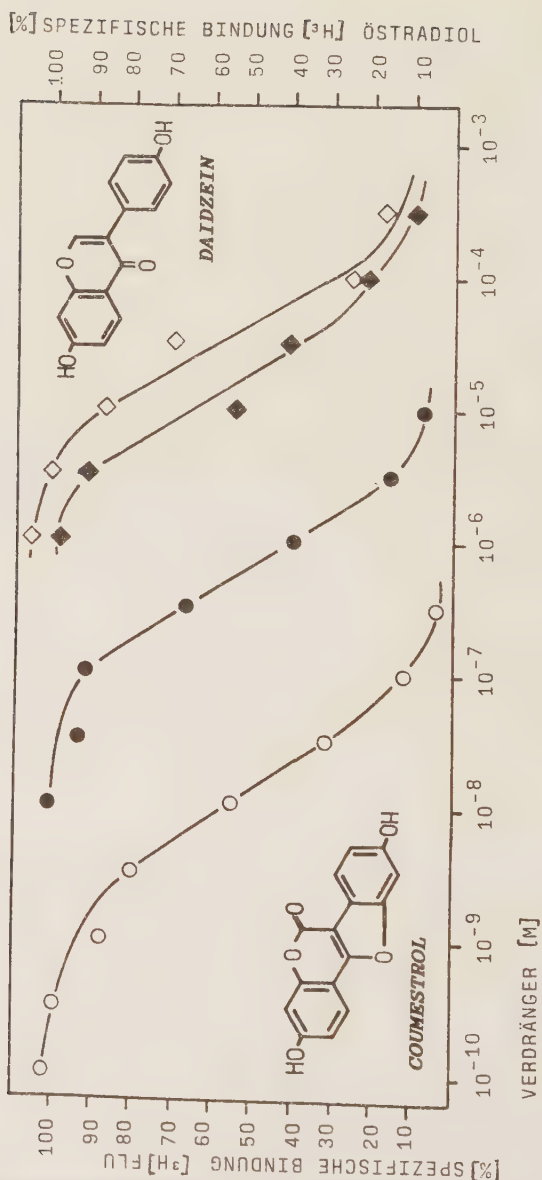


Abb. 51: Verdrängung von [³H]FLU durch Daidzein (◆) im Vergleich mit Coumestrol (●) und [³H]Östradiol durch Daidzein (◇) und Coumestrol (○); Dreifachbestimmungen wurden jeweils durchgeführt (Inkubationsbedingungen vergl. Tabellen 4 und 5). Zu den IC₅₀-Werten vergl. Tabelle 31

Auffallend ist, daß das Flavon Apigenin, welches wie z.B. Genistein eine meta-Hydroxylierung am Ring A aufweist, eine gute Dosis-Wirkungs-Korrelation in der Verdrängung von [^3H]FLU aufgrund einer veränderten Elektronenverteilung im Molekül zeigt; die ermittelte IC_{50} beträgt hier $1,2 \times 10^{-4}\text{M}$ (vergl. Abb.53 sowie Tabelle 31)).

Interessant ist auch das Ergebnis der Östrogenrezeptor-Bindungsstudie. Nur für die beiden als Östrogen bekannten Isoflavone Genistein und Daidzein konnte ein IC_{50} -Wert aus einem logit-log-Plot bestimmt werden. In Verdrängungsexperimenten von [^3H]Östradiol wurde für Genistein eine IC_{50} von $1,6 \times 10^{-6}\text{M}$ und für Daidzein eine IC_{50} von $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ermittelt (Abb.51 und 52). Auch hier zeigt das 7-O-Glykosid Daidzin keine effektive Rezeptor-Affinität. Die meta-Hydroxylierung am Ring A beim Genistein scheint einen günstigen Einfluß auf die Bindung am Östrogenrezeptor zu haben.

Alle anderen als Östrogen beschriebenen Isoflavone (WONG, 1975; SACHSE, 1974) wie Formononetin, Biochanin A, Praten-
sein und das Prunetin zeigen ähnlich wie beim Membranrezeptor nur geringe Verdrängungsraten in einer Konzentration von 10^{-4}M (vergl. Tabelle 31).

Eine relativ starke Wirkung im Östrogenrezeptor-Assay hat Lupinalbin A (Abb. 52) mit einer IC_{50} von $5,8 \times 10^{-7}\text{M}$ (Tabelle 31), welches sich durch eine zusätzliche Ätherbrücke von Genistein unterscheidet. Apigenin zeigte mit einer IC_{50} von $2,3 \times 10^{-4}\text{M}$ eine leichte Östrogenrezeptor-Aktivität bei signifikanter Dosis-Wirkungs-Relation (Abb. 53).

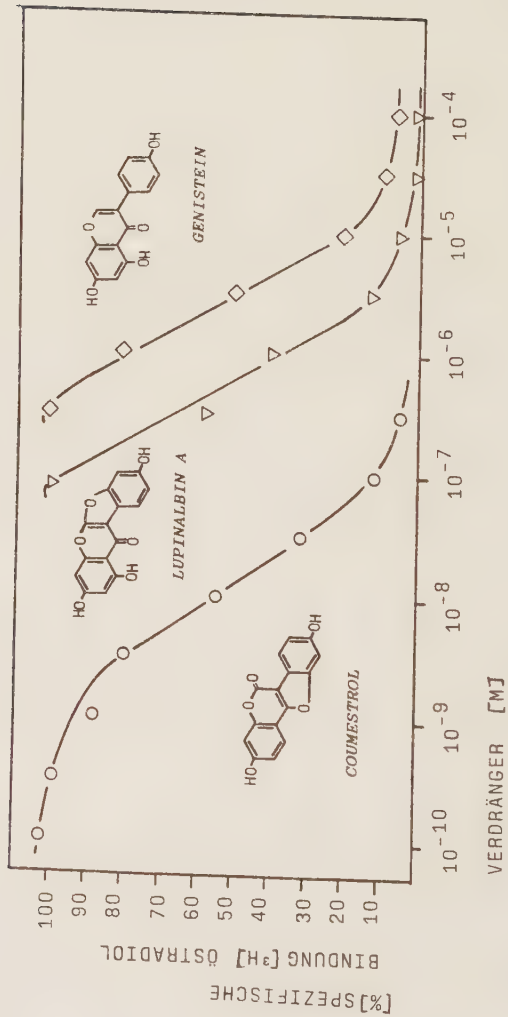


Abb. 52: Verdrängung von [³H]Östradiol im Östrogenrezeptor-Bindungsassay durch Lupinalbin A (▽) und Genistein (◇) im Vergleich mit Coumestrol (○); jeweils Dreifachbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 5)

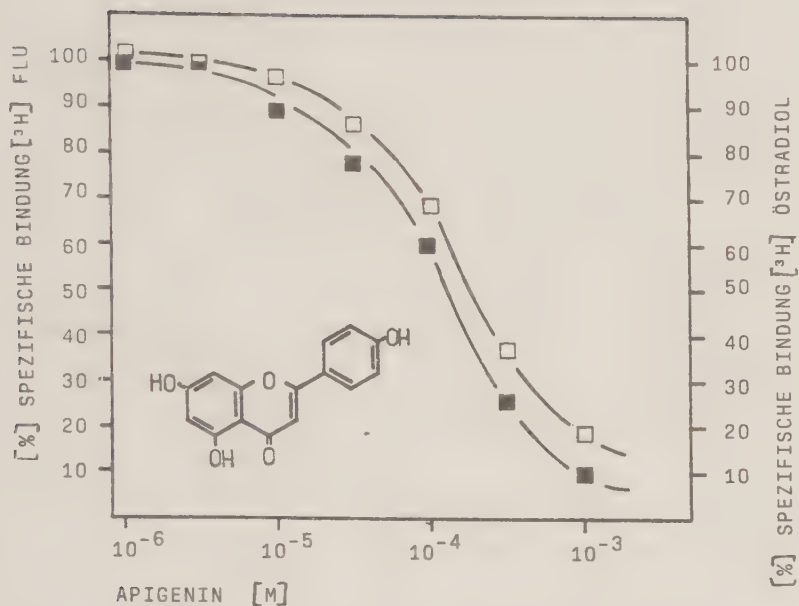
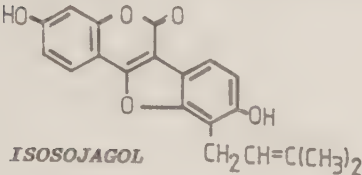
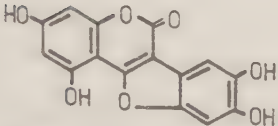
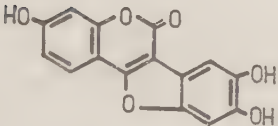
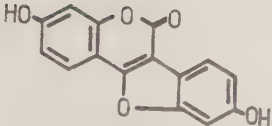
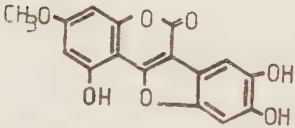
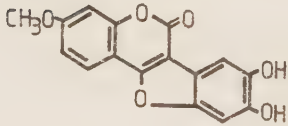
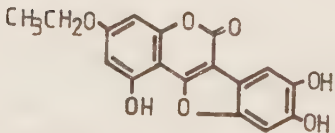
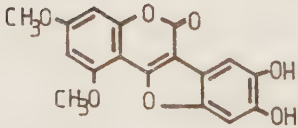


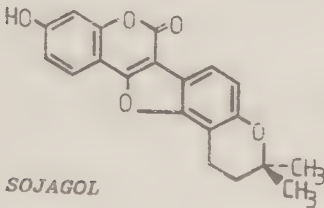
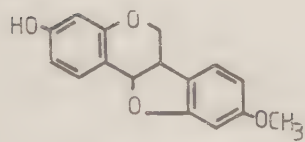
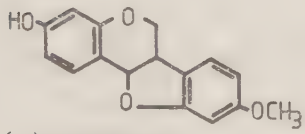
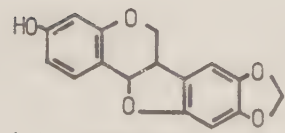
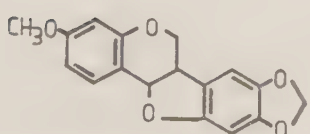
Abb. 53: Verdrängung von [³H]FLU (■) und [³H]Östradiol (□) durch Apigenin im Rezeptorassay; jeweils Dreifachbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4 und 5). Zu den IC₅₀-Werten vergl. Tabelle 31.

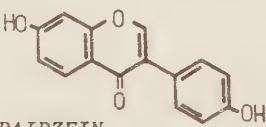
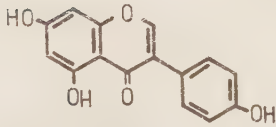
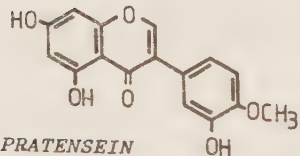
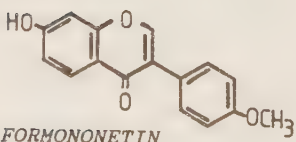
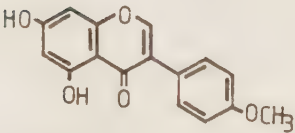
Bei Vergleich von Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor-Affinität östrogenen Isoflavone findet man eine gute Korrelation der Dosis-Wirkungs-Kurven für das dihydroxylierte Daidzein (Abb. 51). Allgemein wirkten solche östrogenen Isoflavone im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay schwach, welche auch die [³H]Östradiol-Bindung nur geringfügig beeinflussten, wie z.B. Formononetin, Biochanin A und Pratensein. Eine Ausnahme bildet das Genistein, welches zwar gute Affinität zum Östrogenrezeptor besitzt, aber keine spezifische Bindung zum Benzodiazepinrezeptor zeigt.

TABELLE 31: Verdrängung der Radioligand-Bindung in Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor-Bindungsassay durch Coumestane, Pterocarpane, östrogene Isoflavone u.a.. Die Indizes der IC-Werte geben jeweils die bei der genannten Verdränger-Konzentration ermittelte prozentuale Inhibition an. IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe des jeweiligen logit-log-Plot ermittelt; jeweils Dreifachbestimmungen (Inkubationsbedingungen vergl. Tabelle 4 und 5)

STRUKTUR	[³ H]FLU	[³ H]ÖSTRADIOL
 <i>ISOSOJAGOL</i> $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	IC₅₀ : 1,3 x 10⁻⁷ M	IC₅₀ : 1,8 x 10⁻⁷ M
 <i>DEMETHYL-WEDELOLACTON</i>	IC₅₀ : 2,0 x 10⁻⁷ M	IC₄₀ : 1,0 x 10⁻⁴ M
 <i>DEMETHYL-5-DEHYDROXY-WEDELOLACTON</i>	IC₅₀ : 3,9 x 10⁻⁷ M	IC₅₀ : 8,0 x 10⁻⁶ M
 <i>COUMESTROL</i>	IC₅₀ : 4,1 x 10⁻⁷ M	IC₅₀ : 1,3 x 10⁻⁸ M

STRUKTUR	[³ H]FLU	[³ H]ÖSTRADIOL
 WEDELOLACTON	IC₅₀ : 1,6 x 10⁻⁶ M	
 5-DEHYDROXY-WEDELOLACTON	IC₅₀ : 2,8 x 10⁻⁵ M	IC₃₂ : 1,0 x 10⁻⁴ M
 DEMETHYL-7-ETHYL- WEDELOLACTON	IC₅₀ : 9,6 x 10⁻⁶ M	IC₂₅ : 3,0 x 10⁻⁴ M
 5-METHYL-WEDELOLACTON	IC₂₃ : 1,0 x 10⁻⁴ M	IC₁₁ : 1,0 x 10⁻⁴ M

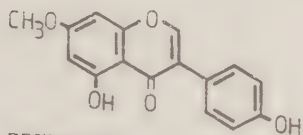
STRUKTUR	[³ H]FLU	[³ H]ÖSTRADIOL
 SOJAGOL	IC₅₀ : 1,0 x 10⁻⁴M	IC₅₇ : 1,0 x 10⁻⁴M
 (+/-) MEDICARPIN	IC₅₀ : 1,4 x 10⁻⁴M	IC₅₀ : 8,0 x 10⁻⁵M
 (-) MEDICARPIN	IC₄₃ : 1,0 x 10⁻³M	IC₄₃ : 1,0 x 10⁻³M
 (-) MAACKIATIN	IC₁₁ : 3,0 x 10⁻⁴M	IC₅₀ : 1,8 x 10⁻⁴M
 PTEROCARPIN	IC₄₀ : 1,0 x 10⁻⁴M	IC₁₁ : 1,0 x 10⁻³M

STRUKTUR	[³ H]FLU	[³ H]ÖSTRADIOL
 DAIDZEIN	IC ₅₀ : 3,0 x 10 ⁻⁵ M	IC ₅₀ : 5,0 x 10 ⁻⁵ M
 GENISTEIN	IC ₄₀ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M	IC ₅₀ : 1,6 x 10 ⁻⁶ M
 PRATENSEIN	IC ₃₁ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M	IC ₃₅ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M
 FORMONONETIN	IC ₂₃ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M	IC ₄₃ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M
 BIOCHANIN A	IC ₁₅ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M	IC ₃₃ : 1,0 x 10 ⁻⁴ M

STRUKTUR

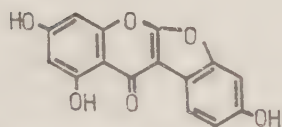
[³H]FLU

[³H]ÖSTRADIOL



PRUNETIN

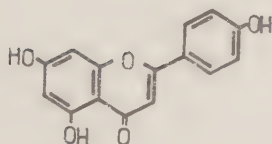
IC₄₃:
1,0 x 10⁻⁴M



LUPINALBIN A

IC₂₇:
1,0 x 10⁻⁴M

IC₅₀:
5,8 x 10⁻⁷M



APIGENIN

IC₅₀:
1,2 x 10⁻⁴M

IC₅₀:
2,3 x 10⁻⁴M

IV. DISKUSSION

"Vom Molekülroulette zum Drug-Design" (SCHWERTHÖFFER, 1987) ist ein Artikel der Süddeutschen Zeitung vom 26. März 1987 überschrieben. Dieser Artikel stellt einer breiten Öffentlichkeit moderne Methoden der theoretischen Chemie, das sogenannte "Drug-Design", als Strategie der Arzneistoff-Entwicklung vor.

Die vorliegende Arbeit belegt, daß ein traditioneller Weg der Arzneimittel-Entwicklung, "bei der man entweder Wirkstoffe aus Pflanzen und Kräutern extrahierte (etwa Chinin) oder zufällige Laborbefunde (wie Penicillin) weiterverfolgte" (SCHWERTHÖFFER, 1987), weiterhin ein fundamentales Werkzeug bei der Pharmakon-Entwicklung und bei der Charakterisierung von Metaboliten von Nutz- und Arzneipflanzen, ad rem der entsprechenden Zellkulturen, darstellt. In der Einleitung wurden zahlreiche Beispiele (ARENS et al., 1982; ARENS et al., 1986; IKUTA und ITOKAWA, 1988) beschrieben. Darüberhinaus leistet die konventionelle Methode einen Beitrag zum Verständnis der Wirkqualitäten und -mechanismen einzelner Metabolite, seien es Komponenten von Nahrungsmitteln, seien es Toxine oder Pharmaka. Im besonderen sind hier anhand vorliegender Experimentalbefunde folgende Probleme diskutiert:

- Möglichkeiten und Grenzen des gewählten Detektionsverfahrens: Rezeptorologische Methoden zur Detektion pharmakologisch aktiver Sekundärmetabolite bei Pflanzen-Zellkulturen
- Sanguinarin ein opioides Benzophenanthridin ?
- Gehalt und Isolation Benzodiazepinrezeptor aktiver Metabolite bei Phaseolus radiatus Zellkulturen.
- Ist Sojagol ein Sekundärmetabolit bei Phaseolus radiatus ?
- Östrogenität und Benzodiazepinrezeptor-Aktivität von Isoflavonoiden

- Möglichkeiten und Grenzen des gewählten Detektionsverfahrens: Rezeptorologische Methoden zur Detektion pharmakologisch aktiver Sekundärmetabolite

Neben alt bewährten chromatographischen Verfahren, z.B. Dünnschicht- und Gaschromatographie sowie der HPLC-Analyse findet man immer häufiger das Einbeziehen biologischer Testverfahren zu analytischen Bestimmungen definierter - bekannter oder unbekannter- chemischer Strukturen.

Hier vor allem zu nennen sind wie in der Einleitung bereits erwähnt der Radioimmunoassay sowie die ELISA-Technik. Bei Verwendung solcher immunologischer Testverfahren ist es z.B. möglich, in einem Substanzgemisch einen speziellen bekannten Metaboliten zu identifizieren sowie seine Konzentration auch in Anwesenheit einer Vielzahl anderer Verbindungen zu ermitteln (WEILER und ZENK, 1976; ARENS et al., 1978; WESTEKÄMPER et al., 1980; WEILER et al., 1981; KOLOSSA, 1983; SUND, 1978; HODGES und RAPOPORT, 1982; HSU et al., 1983).

Während solche immunologischen Verfahren definierte bekannte Strukturen rein quantitativ dedektieren, machen sich andere in vitro Testsysteme, z.B. pharmakologische in vitro Studien wie der Maus-Makrophagen-Chemilumineszenz-Assay (PARNHAM et al., 1983; ARENS et al., 1986), die Inhibition der Cyclooxygenase beim CVP(=Cobra Venom Factor) induziertem Pfoten-Ödem (LEYCK et al., 1983; ARENS et al., 1985) sowie Rezeptor-Bindungsstudien (ARENS et al., 1982) eine definierte Wirkqualität zunutze, einen mit dieser Eigenschaft ausgestatteten Metaboliten in einem Substanzgemisch zu entdecken. Wie einleitend erwähnt (I.) ist hier die definierte Wirkung, nicht aber die definierte Struktur Unterscheidungsmerkmal und Abgrenzung zu allen anderen Verbindungen im Substanzgemisch.

Neben der Möglichkeit, diesen definierten Stoff zu detektieren, wird gleichzeitig ein Stoff mit einer speziell ausgewählten Wirkqualität wahrgenommen. Diese spezifische Eigenschaft des Stoffes, seine Wirkqualität, ermöglicht die Präsenz des aktiven Prinzips in einem Substanzgemisch immer wiederzufinden, z.B. in einzelnen Fraktionen bei der Isolation und Reinigung des Wirkstoffs. Dabei können unbekannte, noch nicht beschriebene Strukturen selektioniert werden, aber auch Stoffe bekannter Struktur als ein Wirkstoff im gewählten Testsystem identifiziert werden. Eine gezielte Wirkstoff-Isolation aus einem reichen Angebot vieler anderer Metabolite ohne diese Wirkqualität kann somit vorgenommen werden.

Gewiß liegt diesen genannten biologischen Detektionsverfahren eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit zugrunde. Im Gegensatz zu immunologischen Techniken bedarf es bei pharmakologischen Testsystemen darüberhinaus einer Zuordnung der Aktivität zu einer definierten Struktur. Wie im näheren noch auszuführen ist, ist diese Zuordnung der im vorliegenden Testsystem ermittelten Aktivität zu einer spezifischen Komponenten im Substanzgemisch ein Kernproblem pharmakologisch gezielter Naturstoff-Isolation.

Dosis-Wirkungs-Kurven rezeptorologischer "displacement"-Experimente, wie z.B. Abb. 2 und Abb.3 machen deutlich, daß das Vorliegen einer gegebenen Ligandenkonzentration eines spezifischen, hoch selektiven Wirkstoffs wie z.B. Diprenorphin bei Opiatrezeptoren oder Clonazepam beim Benzodiazepinrezeptor entscheidend ist für die gemessene Konzentration des Rezeptor-Radioligand-Komplexes [RL] (vergl. II.4.3.). Dies gilt natürlich auch bei Applikation einer Testlösung, z.B. methanolischer Extrakte aus Kallusgewebe (III.1.). Geht man davon aus, daß in einem solchen

speziellen Extrakt ein Rezeptor aktiver Metabolit I_1 mit definierter Konzentration $[I_1]$ vorhanden ist, so ist nicht nur die Affinität dieses Metaboliten, ausgedrückt im IC_{50} -Wert, für die gemessene $[RL]$ entscheidend, sondern ebenso die Konzentration der verdrängenden Komponenten $[I_1]$.

Ist z.B. der IC_{50} -Wert von I_1 entsprechend klein, also die Affinität von I_1 verhältnismäßig groß, so kann aufgrund einer äußerst niedrigen Konzentration $[I_1]$ dieses Wirkstoffs im methanolischen Extrakt die im Rezeptorassay gemessene Verdrängung dennoch einen niedrigen Wert, z.B. 30% ausmachen (vergl. II.4.3.). Es kann letztlich nicht unmittelbar entschieden werden, welche Ursache einer im Rezeptorassay ermittelten niedrigen Verdrängungsrate zugrundeliegt. Neben einer geringen Rezeptoraffinität ist eine niedrige Konzentration des aktiven Metaboliten im Rezeptorassay eine mögliche Ursache für niedrige Verdrängungsraten untersuchter Extrakte aus Kallusgewebe (vergl. Tabelle 7).

Umgekehrt ist jedoch auch denkbar, daß ein wenig Rezeptor aktiver Metabolit in ausreichend hoher Konzentration im methanolischen Extrakt vorhanden ist, so daß höchste Verdrängungsraten der Radioligand-Bindung detektiert werden. Ein Beispiel ist hier die Wirkung des bei den Berberidaceen neben Berberin häufig vorkommenden Jatrorrhizin, einem Benzylisochinolin-Alkaloid. Während in einer Konzentration von $10^{-4}M$ Jatrorrhizin 77% Hemmung der spezifischen $[^3H]$ Naloxon-Bindung im Opiatrezeptor-Bindungsassay zeigt, kann für eine Konzentration dieses Alkaloids von $10^{-5}M$ im Assay keine Opiatrezeptor-Aktivität belegt werden (0% Inhibition der Radioligandbindung).

Gleichzeitig verifiziert dieses Beispiel die Schwierigkeit, unspezifische Membraneffekte, welche darüberhinaus die Radioligandbindung beeinflussen, bei vorliegenden Tester-

gebnissen (Tabelle 7) abzuschätzen. Diese können sowohl durch eine Monokomponente (Beispiel Jatrorrhizin) oder mehrere Inhaltstoffe in einem Substanzgemisch verursacht sein, vorausgesetzt, daß das verwendete Lösungsmittel auf seinen Einfluß am Bindungsverhalten des Radioliganden überprüft wurde, wie z.B. der Einfluß von Methanol auf die [^3H]FLU-Bindung im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay (vergl. II.4.3).

Ein weiteres Indiz für das Vorliegen unspezifischer Rezeptoraktivität in Extrakten aus Kallus-Zellkulturen läßt sich häufig schon anhand des Vergleichs erreichter Verdrängungsraten in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay erkennen. Bei verschiedenen Eschscholtzia Spezies und Stämmen (vergl. Tabelle 7) findet man hohe Verdrängungsraten besonders für [^3H]Naloxon im Opiatrezeptor-Assay, aber auch verhältnismäßig hohe Werte der Inhibition der [^3H]FLU-Bindung, z.B. bei Eschscholtzia californica (Stamm: ECO 1088) mit 84% Inhibition der [^3H]Naloxon- und 43% Inhibition der [^3H]FLU-Bindung im jeweiligen Rezeptorassay. Ist der Wert für die Bindung des Opioids niedriger, so finden sich ebenfalls verminderte Verdrängungsraten für [^3H]FLU.

Das oxidierte Benzophenanthridin Macarpin, ein Hauptalkaloid bei Eschscholtzia Arten zeigte in einer Konzentration von 10^{-4}M im jeweiligen Bindungsassay eine Inhibition der [^3H]Naloxon-Bindung von 88% und der [^3H]FLU-Bindung von 42%. Aus den Tabellen 7 und 9 ist ersichtlich, daß nicht alle Eschscholtzia Arten und Stämme in den durchgeführten Rezeptorstudien hohe Verdrängungsraten zeigen. Dieser Befund könnte wiederum auf das oben dargelegte Problem einer niedrigen Wirkstoff-Konzentration in methanolischen Extrakten zurückgeführt werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt konnten z.B. bei Zellkulturen von Catharantus roseus und Hyoscyamus recht große Differenzen der Alkaloid-

Akkumulation selbst für einzelne Zellen und Klone nachgewiesen werden (ZENK et al., 1977; OKSMAN-CALDENTY und STRAUSS, 1986). Diese Unterschiede manifestieren sich in vorliegenden Rezeptorstudien in erniedrigten Verdrängungsraten für die jeweiligen Radioliganden.

Häufig lassen sich jedoch unspezifische Membraneffekte und damit verbundene Hemmung der Radioligand-Bindung am Rezeptorprotein durch Einsatz verschiedener Konzentrationen des Extrakts oder Wirkstoffs feststellen, wie in den Kapiteln III.2.1. und III.3.2. belegt. In ähnlicher Weise wurden verschiedene Konzentrationen (1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen) eines methanolischen Extrakts einer Kalluskultur der Spezies Berberis lycium (vergl. Tabelle 7) im Opiatrezeptor-Bindungsassay untersucht. Es konnte eine gute Dosis-Wirkungs-Relation der [^3H]Naloxon-Verdrängung gezeigt werden. Da für den hier vorkommenden Metaboliten Jatrorrhizin keine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt werden konnte, liegt der Schluß nahe, daß zumindest bei Extrakten aus Berberis lycium weitere Komponenten eine Opiatrezeptor-Aktivität aufweisen. Magnoflorin, ein Benzylisochinolin-Alkaloid, wurde in einer Konzentration von 10^{-4}M auf seine Opiatrezeptor-Aktivität untersucht. Es wurden 20% Inhibition der spezifischen [^3H]Naloxon-Bindung ermittelt.

Aus diesen Ergebnissen insgesamt kann man ableiten, daß additiv synergistische Effekte auf die Radioligand-Bindung bei Studien der Rezeptoraktivität methanolischer Extrakte aus Kallusspezies dem ermittelten Wert zugrundeliegen können. Hemmt z.B. eine Komponente A die Radioligand-Bindung um 20% bei gegebener Konzentration, eine Komponente B etwa 25% und ein dritter Metabolit des Extrakts um 30% die Bindung des markierten Liganden, dann würde insgesamt mit mindestens 75% Hemmung der spezifischen Radioligand-Bindung diese Kallusspezies eine besonders signifikante Rezeptoraktivität

zeigen, ohne jedoch besonders aktive Metabolite aufweisen zu müssen. Bei Phaseolus radiatus konnten mehrere Wirkkomponenten detektiert werden (Abb.18; III.3.3.). Jedoch lassen in diesem Fall die in der Suspensionskultur detektierten Wirkstoff-Konzentrationen (vergl. III.3.7.) darauf schließen, daß im Rohextrakt hauptsächlich die ermittelte signifikante Inhibition der spezifischen [3 H]FLU-Bindung auf die Wirkung der Hauptkomponente Coumestrol zurückzuführen ist.

Durch verschiedene Komponenten methanolischer Extrakte aus Kallusgewebe ist auch ein Antagonismus denkbar, eine Interferenz von Stoffen, wodurch ein möglicher Effekt weiterer Inhaltstoffe auf die Radioligand-Bindung nicht detektierbar wird. Gemeint sind hier Strukturen, welche als allosterische Modulatoren wirken wie z.B. GABA auf die Bindung von Benzodiazepinen am Benzodiazepinrezeptor (Abb. 61). Beim Vorliegen eines positiv allosterischen (allosteros $\equiv$ an anderer Stelle) Modulators, z.B. GABA kommt es aufgrund der Bindung von GABA am Rezeptorprotein zu einer erhöhten Affinität des Benzodiazepins mit Agonisten-Qualität zum Rezeptor. Damit ist eine höhere Konzentration des Verdrängers, z.B. bei einem partiellen Agonisten oder besonders Antagonisten erforderlich, um die gleiche prozentuale Inhibition der spezifischen [3 H]FLU-Bindung zu erreichen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit solcher positiv allosterischer Effektoren sowie eines Wirkmetaboliten im methanolischen Extrakt ist der Wert der Verdrängungsrate des Wirkmetaboliten erniedrigt. Im etablierten Testsystem konnten allerdings solche Effekte, wie z. B. ein Einfluß von GABA auf die [3 H]FLU-Bindung nicht beobachtet werden.

Viele Sekundärmetabolite, welche möglicherweise eine Rezeptor-Aktivität besitzen könnten, findet man bei der Pflanze (FROHNE und JENSEN, 1985) wie auch bei pflanzlichen Zellkulturen in glykosidisch gebundener Form. Wie vorliegende

Experimentalbefunde belegen, verlieren Rezeptor aktive Aglyka häufig ihre Aktivität durch die glykosidische Bindung. Ein Beispiel hier ist der Wirkungsverlust von Daidzein im Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor-Bindungsassay durch Glukosidierung zum Daidzin (vergl. III.4.3.). Das 7- β -Glukosid des Coumestrols, Coumestrin (LE-VAN, 1984), wurde aus Wurzeln von Glycine max isoliert. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die β -glykosidische Bindung des Coumestrols bei Phaseolus radiatus Zellkulturen gezeigt (III.3.4.). Mit Bezug auf Abb.14 sowie Tabelle 20 (vergl. III.3.3.) läßt sich annehmen, daß auch hier die Glykosidierung des Coumestrols zum Wirkungsverlust des aktiven Aglykon im Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay führt. Eine allgemein daraus resultierende Problematik hinsichtlich der Detektion solcher Strukturen mit rezeptorologischen Bindungsstudien ist die Maskierung Rezeptor aktiver Wirkstoffe durch glykosidische Bindung.

Die dargelegten Aspekte der Möglichkeiten und Grenzen rezeptorologischer Detektion von Pflanzeninhaltsstoffen belegen die Schwierigkeit, Entscheidungskriterien zur Auswahl interessanter Objekte für eine Wirkstoff-Isolation und Wirkstoff-Identifizierung zu setzen. Ein fundamentales Kriterium bleibt aber stets neben allen anderen Aspekten die Wirkstoff-Konzentration im untersuchten Gewebe. Der mögliche Erfolg, eine Wirkkomponente neuer Struktur zu isolieren, hängt ganz entscheidend davon ab, ob ausreichende Mengen des Metaboliten für eine Strukturaufklärung verfügbar sind.

Nicht allein die Auswahl der Zellkultur, welche Rezeptor aktive Wirkstoffe besitzt, ist problematisch, sondern auch die Zuordnung der Rezeptoraktivität zu einer chromatogra-

phisch detektierbaren Extrakt-Komponenten erweist sich als äußerst schwierig (vergl. Tabelle 23). Gewiß ist das gewählte chromatographische Trennsystem entscheidend für eine optimale Zuordnung sowie eine Abgrenzung oder einen Ausschluß weniger interessanter Metabolite. Hier gelten für einzelne

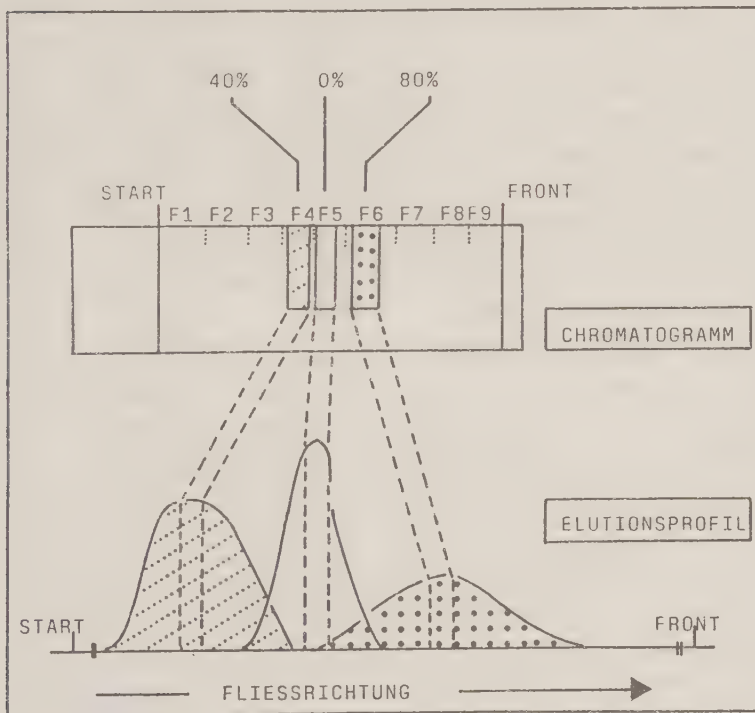


ABB. 54: Beispiel einer DC-Präparation eines Extrakts mit drei detektierten Komponenten, Substanz I₁ [] (mit leichter Rezeptoraktivität (40% Inhibition der Radioligand-Bindung), I₂ [] (inaktiv im Rezeptorassay), I₃ [] (hohe Rezeptoraktivität, 80% Inhibition der Radioligand-Bindung). F1-F9: einzelne Fraktionen (Banden) der DC-Präparation

erhaltene Fraktionen ähnliche Auswahlkriterien wie oben bereits für methanolische Extrakte erwähnt. Ein Beispiel vorliegender Problematik sollte jedoch auch in Bezug auf die Zuordnung des Wirkstoffs in einem Gemisch aus einer Vielzahl UV detektierbarer Extraktkomponenten erwähnt sein (Abb. 54).

Sicherlich ließe sich Abb. 54 mathematisch mit Definitionen der Mengenlehre wie Teilmenge beschreiben. Hier aber soll anhand des Beispiels die Detektion der Wirkkomponenten in einem chromatographisch getrennten Extrakt beleuchtet werden. Das Chromatogramm zeigt drei distinkte Banden, denen drei Komponenten I₁, I₂ und I₃ zugeordnet werden können, wovon I₁ eine geringe Rezeptoraffinität und I₃ eine hohe Affinität zum Rezeptor im Bindungsassay aufweist. I₂ ist wirkungslos (dies als Annahme für das abgebildete Beispiel).

Vor der Isolation dieser einzelnen Metabolite und der Ermittlung der Aktivität der jeweiligen Monokomponenten kann nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ob I₂ per se Rezeptor aktiv ist, oder aufgrund des Elutionsprofils bei Fraktion 5 eine Rezeptoraktivität ermittelt wurde, selbst bei anschließender DC-Analyse solcher eluierter Banden. Genau diese Problematik lag bei der Zuordnung der Benzodiazepinrezeptor-Aktivität von WK1, WK2 und WK3 vor (vergl. III.3.3.). Ähnlich schwierig war die Situation bei der Reinigung von Sanguinarin aus Bocconia cordata Suspensionskulturen (vergl. Abb. 8c). Es konnte nicht belegt werden, ob auch die hier rötlich fluoreszierende Komponente (Abb. 8c) eine Opiatrezeptoraktivität besitzt, da nie ausreichende Mengen des Metaboliten von Sanguinarin getrennt werden konnten. Einschlägige Werke wie "Chromatographische Trennmethode" (SCHWEDT, 1979) machen generell auf solche Probleme der Auflösung bzw. Beurteilung der Trennung von Stoffen in chromatographischen Verfahren aufmerksam.

- Sanguinarin ein opioides Benzophenanthridin ?

Sanguinarin (*sanguinarius* = blutdürstig), ein quaternäres Benzophenanthridin-Alkaloid, findet man bei vier verschiedenen Pflanzenfamilien, den Papaveraceen, den Fumariaceen, den Rutaceen und der Sapindaceae Pteridophyllum (KRANE et al., 1984; SIMANEK, 1985). Zahlreiche Autoren berichten vom Vorkommen des Sanguinarins bei den Fumariaceen Corydalis, Dicentra und Fumaria (KRANE et al., 1984; SIMANEK, 1985). Nicht nur beim Genus Bocconia, sondern vielen anderen Papaveraceen, namentlich Argemone, Chelidonium, Dicranostigma, Eschscholtzia, Glaucium, Hunnenmannia, Hylomecon, Hypercoum, Macleaya (= Bocconia, vergl. KRANE et al., 1984; jedoch Unterschiede im Vorkommen an Benzophenanthridin-Alkaloiden, KRANE et al., 1984), Meconopsis, Papaver, Platystemon, Romneya, Sanguinaria, Stylomecon und Stylophorum ist Sanguinarin nachgewiesen worden. Xanthoxylum ist eine Rutaceae, bei welcher man dieses Benzophenanthridin findet (KRANE et al., 1984).

Viele Kallusspezies der genannten Geni, bei welchen Sanguinarin vorkommt - zumindest bei der Pflanze, wurden in Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassay untersucht (vergl. Tabelle 7). Zehn Kalluskulturen von sieben verschiedenen Argemone-Spezies, von denen bei drei Arten verschiedene Stämme getestet wurden, zeigten eine Hemmung der [³H]Naloxon-Bindung um 40-50%. Nur bei Argemone ochroleuca (Stamm: 561) konnten 82% Inhibition der Radioligand-Bindung im Opiatrezeptor-Assay ermittelt werden. Auch der Wert für die Verdrängung von [³H]FLU war mit 56% relativ hoch. Für Sanguinarin konnte allerdings im Benzodiazepinrezeptor-Assay in einer Konzentration von 10⁻⁴M und 10⁻⁶M nur eine Hemmung von jeweils 20% und 5% Inhibition der Radioligandbindung ermittelt werden. Man kann daher vermuten, daß bei der getesteten Spezies nicht ausschließlich Sanguinarin ein möglicher Verdränger war.

Auch Chelidonium-Arten (drei verschiedene Kallusspezies) wurden im Rezeptorassay untersucht. Es konnte keine signifikante Aktivität im Opiatrezeptor-Bindungsassay ermittelt werden, so daß auch für diese Kalluskulturen anzunehmen ist, daß ihr Gehalt an Sanguinarin entsprechend niedrig ist, falls es hier vorkommt.

15 Kalluskulturen der Gattung Corydalis entstammten neun verschiedenen Spezies (vergl. Tabelle 7). Nur bei Corydalis heterocarpa konnten im Opiatrezeptor-Assay etwa 80% Inhibition der [^3H]Naloxon-Bindung ermittelt werden. Bei Dicentra spectabilis konnten nur 46% Inhibition der [^3H]Naloxon-Bindung gemessen werden. Es ist nicht auszuschließen, daß bei den letzt genannten Beispielen wiederum Sanguinarin das aktive Prinzip darstellt, besonders da die Werte für die Inhibition der [^3H]FLU-Bindung äußerst niedrig sind.

Wie unter III.1.2. bereits berichtet zeigen die Benzophenanthridin-Alkaloide Macarpin und Dihydromacarpin, welche man vor allem bei Eschscholtzia-Arten findet (KRANE et al., 1984), eine Inhibition der [^3H]Naloxon-Bindung von 88% und 52% in einer Konzentration von jeweils 10^{-4} und 10^{-5}M . Ob bei den untersuchten Eschscholtzia-Arten - zehn verschiedene Spezies bei 19 untersuchten Gewebekulturen (Tabelle 7) - auch Sanguinarin seine Wirkung entfaltet (s.o. Kapitel IV. "additiver Synergismus") kann nicht ausgeschlossen werden beim Vorliegen von 0-91% Inhibition der spezifischen [^3H]Naloxon-Bindung. Die Werte für die Hemmung der [^3H]FLU-Bindung (0-43% Inhibition) belegen allenfalls, daß nicht Sanguinarin das aktive Prinzip bei Eschscholtzia-Spezies mit signifikant hohen Verdrängungsraten darstellt.

Für Fumaria- und Papaver-Arten wurden allgemein relativ niedrige Verdrängungsraten für [^3H]Naloxon und [^3H]FLU im Rezeptorassay ermittelt. Entweder ist in den getesteten

Kallusspezies kein oder nur eine geringe Konzentration Sanguinarin enthalten. Demgegenüber findet man bei Glaucium-Arten ein recht unterschiedliches Ergebnis. Es wurden neun Kalluskulturen von fünf verschiedenen Glaucium-Spezies untersucht. Die [^3H]Naloxon-Inhibition lag hier ziemlich hoch. Viele Vertreter zeigten über 90% Hemmung, Extrakte aus Glaucium elegans hemmten in eingesetzter Konzentration mit 97% die [^3H]Naloxon-Bindung (höchst erreichter Wert bei Papaveraceae). Aber auch hier findet man Kallusspezies mit geringen Aktivitäten, z.B. Glaucium vitellinum mit nur 11% Inhibition der [^3H]Naloxon-Bindung. Daß bei solchen Vertretern mit hohen Verdrängungsraten auch bei Glaucium die Aktivität nicht allein auf Sanguinarin zurückgehen kann, zeigt sich im Vergleich mit der [^3H]FLU-Verdrängung, da hier ebenfalls mehr als 30% Inhibition gemessen werden konnte, eine Aktivität die nicht auf das Sanguinarin zurückgeht.

Hohe Konzentrationen Sanguinarin findet man im orangefarbenen Latex der Stengel und Blätter von Chelidonium majus, einer in Eurasien beheimateten Papaveraceae, neben Chelidonin und Chelerythrin. Chelidonium Extrakte wurden als Choleretikum und Spasmolytikum verwendet (GESSNER und ORZECOVSKI, 1974). Der klinische Gebrauch ist erstmals in der russischen Literatur 1896 (CORDELL, 1981) beschrieben. In Europa besitzt Chelidonium majus eine lange Geschichte bei der Behandlung von Warzen, dem Papillom und Kondylom (CORDELL, 1981).

Sanguinarin zeigt antimikrobielle Wirkungen (ODEBIYI und SOFOWORA, 1979; MITCHER et al., 1978; LENFELD et al., 1981) sowie anti-inflammatorische Aktivität (LENFELD et al., 1981). Aufgrund seiner geringen Toxizität und hohen anti-inflammatorischen Wirkung wird Sanguinarin zum medizinischen

Gebrauch bei der Behandlung oraler infektiöser Prozesse angewandt. Da Sanguinarin darüberhinaus eine anti- Plaque Aktivität beim Menschen zeigt (SOUTHARD et al., 1988), wird es als eine Komponente von Zahnpasten und Mundwässern benutzt (SIMANEK, 1985). Bei einigen Trichophyton Stämmen zeigt Sanguinarin neben Chelerythrin fungizide Wirkungen (HEJTMANKOWA et al., 1984). Im Gegensatz zu anderen Benzophenanthridinen, d.i. Nitidin und Fagaronin, besitzt das Sanguinarin ebenso wie das Chelerythrin keine Antitumoraktivität, jedoch eine hohe Cytotoxizität (CAOLO und STERMITZ, 1979). Wahrscheinlich ist diese Cytotoxizität des Sanguinarins letztlich verantwortlich für Glaucom, Krebs und andere Krankheiten bei der indischen Bevölkerung nach Verzehr eines Speiseöls, welches unter Verwendung der Samen von Argemone mexicana mit Sanguinarin verunreinigt war (HAKIM et al., 1961).

Die biologische Aktivität der quaternären Benzophenanthridine beruht auf der Planarität des Moleküls sowie der Säurestärke des quaternären Kations (CAOLO und STERMITZ, 1979). Der Reaktion quaternärer Benzophenanthridin-Alkaloide mit Biopolymeren liegen im wesentlichen drei Mechanismen zugrunde: die Bindung des Iminium-Ions mit nucleophilen Gruppen, die Interkalation des Alkaloids mit Basenpaaren der DNA und der Wechselwirkung des quaternären Kations mit anionischen Bindungsstellen von Biopolymeren (SIMANEK, 1985). Die cytotoxische Wirkung des Sanguinarins dürfte ihre Hauptursache in der Interkalation mit DNA-Basenpaaren des Moleküls sowie einer Antitubulinwirkung (CAOLO und STERMITZ, 1979) finden.

Außerst bemerkenswert im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch die Inhibition Na^+/K^+ transportierender ATPasen durch Sanguinarin, welches eine hohe Affinität zu

kardialen Na^+/K^+ -ATPasen (SEIFEN et al., 1979) und Na^+/K^+ -ATPasen des Meerschweinchengehirns (STRAUB und CARVER, 1975) zeigt. Cardiovasculäre Wirkungen des Sanguinarins sind seit 1876 bekannt (SEIFEN et al., 1979) und KELENTEY schlug 1960 eine Digitalis ähnliche Wirkung des Sanguinarins vor (ADAMS, 1978). Die Untersuchung eines positiv inotropen Effektes von Sanguinarin begann 1974 (SEIFEN und STRAUB, 1974). Ein Zusammenhang zwischen positiv inotropem Effekt und Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität konnte beim Meerschweinchenherz belegt werden. 50% Enzyminhibition konnten bei einer Konzentration von $6,0 - 6,5 \times 10^{-6}\text{M}$ erreicht werden (SEIFEN et al., 1979). Die Autoren postulieren, daß Sanguinarin Wechselbeziehungen eingeht mit dem kardialen Digitalisrezeptor. Im gleichen Konzentrationsbereich ($5,62 \times 10^{-6}\text{M}$) hemmt Sanguinarin die Na^+/K^+ -ATPase zu 50% bei isolierten Cerebren des Meerschweinchens (STRAUB und CARVER, 1975). Diese Ergebnisse sind gerade deshalb so interessant, da in der vorliegenden Arbeit eine Inhibition der Radioligand-Bindung von 50% im Opiatrezeptor-Bindungsassay bei einer Konzentration von $5,8 \times 10^{-6}\text{M}$ erreicht wurde, also in demselben Konzentrationsbereich, in dem Sanguinarin die Aktivität von Na^+/K^+ -ATPasen inhibiert (vergl. Tabelle 32).

kardiale Na^+/K^+ -ATPase	$6,0 - 6,5 \times 10^{-6}\text{M}$
cerebrale Na^+/K^+ -ATPase	$5,6 \times 10^{-6}\text{M}$
spezifische [^3H]Naloxon-Bindung am Opiatrezeptor	$5,8 \times 10^{-6}\text{M}$

TABELLE 32: Inhibition (50%) kardialer (SEIFEN et al., 1979) und cerebraler (STRAUB und CARVER, 1975) Na^+/K^+ -ATPasen beim Meerschweinchen und der spezifischen Bindung von [^3H]Naloxon im Opiatrezeptor-Bindungsassay (Ratus ratus) durch Sanguinarin (vergl. III.2.6.).

Der Opiatrezeptor gehört zur Klasse der Neurotransmitter-Rezeptoren, bei welchen die Aktivierung des Rezeptors mit der Öffnung von Ionenkanälen -ein Austausch von Natrium- gegen Kaliumionen- gekoppelt ist. Die Ionenpermeabilität wird hier indirekt reguliert; durch die Konformationsänderung des Rezeptors wird die enzymatische Produktion von cAMP ausgelöst (HÖLTJE, 1982), einem "second messenger", der über eine Proteinkinase das Öffnen von Ionenkanälen vermittelt. Die cAMP-Produktion erfolgt aus ATP durch die Wirkung der Adenylatcyclase, einem Enzym, welches in der Zellmembran lokalisiert und aus mindestens drei Einheiten aufgebaut ist, einem oder mehreren Rezeptorproteinen R, einer katalytischen Einheit C und einem GTP bindenden Regulatorprotein N (MÜLLER und AMMON, 1986). Über eine inhibitorische N-Einheit, N_i , ist der Opioidrezeptor mit der Adenylatcyclase gekoppelt (JAKOB et al., 1985), welche bei seiner Aktivierung inhibiert wird. Es stellt sich daher die Frage (vergl. Tabelle 32), ob Sanguinarin generell Na^+/K^+ -ATPasen verschiedenster Herkunft inhibiert oder hier im besonderen eine opioide Wirkung neben allen anderen beschriebenen Effekten dieses quaternären Benzophenanthridins entfaltet.

Auch wenn über die Struktur der Opioidrezeptoren bis heute nicht viel bekannt ist, so weiß man durch Verwendung alkylierender Agentien wie z.B. N-Ethylmaleimid, daß SH-Gruppen für die Opioidbindung am Rezeptorprotein essentiell sind (SIMON und GROTH, 1975). Es wird angenommen, daß die Inhibition von Na^+/K^+ -ATPasen und von Aminotransferasen (WALTEROVA et al., 1981) durch Sanguinarin über eine Alkylierung von Sulfhydrylgruppen des Enzyms durch die Iminiumbindung des quaternären Kations erfolgt (COHEN et al., 1978). Es konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß die biologische Aktivität quaternärer Benzophenanthridine wie Chelerythrin und Sanguinarin abhängig ist vom Vorliegen des Moleküls als Iminiumion. Bei einem pH-Wert von 7,0 findet man 82% des

Sanguinarins als Iminiumion vor. (CAOLO und STERMITZ, 1979) Im Opiatrezeptor-Bindungsassay wird die Verdrängung des Radioliganden bei einem pH-Wert von 7,4 ermittelt. In diesem pH-Bereich liegt Sanguinarin als Kation vor, so daß hier in Hinblick auf seine pharmakologische Aktivität eine gute Korrelation mit der Literatur (CAOLA und STERMITZ, 1979; STRAUB und CARVER, 1975;) besteht.

Der Verlauf der sigmoidalen Hemmkurve von Sanguinarin im Opiatrezeptor-Bindungsassay (vergl. Abb. 13) ist ähnlich wie bei Experimenten zur Inhibitoraktivität des Sanguinarins gegenüber Na^+/K^+ transportierenden ATPasen (SEIFEN et al., 1979) relativ flach. Häufig deutet ein solcher Kurvenverlauf in "displacement"-Experimenten auf die unterschiedliche Affinität des jeweiligen Verdrängers zu den "multiplen Opioidrezeptoren" (MARTIN et al., 1976; GILBERT und MARTIN, 1976) hin. Genauere Untersuchungen hinsichtlich der Präferenz eines Verdrängers für einen der Opioidrezeptoren können mit Hilfe des "Scatchard Plots" (SCATCHARD, 1949) ermittelt werden. Hier entspricht die Steigung der Geraden der Affinität des Liganden zum Rezeptor. Diese Frage wäre ebenfalls im Hinblick auf eine mögliche Entscheidung interessant, ob Sanguinarin letztendlich auch im Opiatrezeptor-Bindungsassay nur seine Wirkung als Na^+/K^+ ATPase-Inhibitor entfaltet. Darüberhinaus könnte die Untersuchung einer möglichen kompetitiven Inhibition der Radioligand-Bindung durch Sanguinarin zur weiteren Klärung seiner opioden Wirkqualität beitragen.

-Gehalt und Isolation Benzodiazepinrezeptor aktiver
Metabolite bei Phaseolus radiatus Zellkulturen

Wie bereits erwähnt (vergl. III.4.) gehören die Coumestane zu den Isoflavonoiden (WONG, 1975; INGHAM, 1983), einer Gruppe von Verbindungsklassen, denen ein 1,2- Diphenylpropan-Skelett mit dem strukturellen Kennzeichen einer $C_6C_3C_6$ Verzweigung gemeinsam ist (Abb. 55/ WONG, 1975). Ihre taxonomische Verbreitung ist relativ erratisch. Man findet sie vor allem bei Leguminosae (HARBORNE, 1971), und hier besonders bei der Familie der Fabaceae. Auch in einigen anderen Familien wie Rosaceae, Moraceae, Amaranthaceae, Iridaceae und Podocarpaceae kommen sie vor (WONG, 1975).

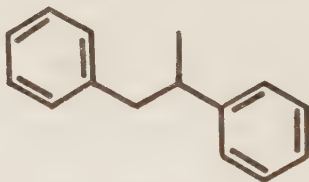


Abb. 55: Grundstruktur der Isoflavonoide (WONG, 1975)

Die Coumaranocoumarin Struktur, welche mit den Trivialnamen Coumestan bezeichnet wurde, stellt die Klasse der höchst oxidierten Isoflavonoide dar (WONG, 1975). Außer bei den Fabaceen findet man Coumestane bei einigen Asteraceen, bei Eclipta alba und Wedelia calendulaceae, bei der Brassicaceae Brassica oleraceae und der Chenopodiaceae Spinacia oleraceae (INGHAM, 1983).

Betrachtet man die für [^3H]FLU erreichten Verdrängungsraten im Benzodiazepin-Rezeptorassay (Tabelle 7), so findet man allgemein niedrige Werte der Inhibition der Radioligand-Bindung bei oben genannten Familien, bei welchen Isoflavonoide und im besonderen Coumestane vorkommen. Bei den Fabaceae konnte nur ein Durchschnittswert von 11% Hemmung der [^3H]FLU-Bindung ermittelt werden, was retrospektiv auf eine niedrige Konzentration an Isoflavonoiden bei den untersuchten Kallusspezies der Fabaceae oder auf das Fehlen solcher Benzodiazepinrezeptor aktiver Isoflavonoidstrukturen schließen läßt.

Bei Phaseolus radiatus konnte eine signifikante Benzodiazepinrezeptor-Aktivität bei Kallus- und Suspensionskultur (Tabelle 7; Tabelle 19) beobachtet werden, die zurückgeht auf das Vorkommen Benzodiazepinrezeptor aktiver Komponenten, die als Isoflavonoide bzw. Coumestane identifiziert wurden. Der Wirkstoffgehalt bei Phaseolus radiatus Zellkulturen war zwar ausreichend hoch, um die Metabolite rezeptorologisch zu detektieren, jedoch bei der Wirkstoffisolation erreichte Ausbeuten waren für eine nachfolgende Strukturaufklärung zu gering. Nur 50 μg Coumestrol pro g Trockengewicht konnten aus Suspensionskulturen von Phaseolus radiatus isoliert werden. Der Gehalt an Isosojagol war zu gering, um eine Präparation in einem Maßstab, der für eine nachfolgende Strukturaufklärung erforderlich ist, durchführen zu können. Isosojagol konnte im Rohextrakt nicht detektiert werden (vergl. Abb. 20; Abb. 32A).

In der vorliegenden Arbeit lagen die ermittelten Gehalte der beiden Coumestane Coumestrol und Isosojagol bei der kultivierten Phaseolus radiatus Pflanze (vergl. II.1.1.1.) deutlich höher (Tabelle 28) als in der Zellkultur; 0,4 mg Coumestrol und 1 mg Isosojagol pro g TG der Wurzel wurden HPLC-analytisch (vergl. II.7.3) ermittelt. Sojagol konnte

weder HPLC-analytisch noch dünn-schichtchromatographisch in methanolischen Rohextrakten aus Organen der Pflanze, ad rem der Wurzel, noch in Extrakten aus Gewebe der Suspensionskultur von Phaseolus radiatus nachgewiesen werden.

Entsprechend der Literatur sind Coumestane als Stressmetabolite anzusehen (INGHAM, 1983). Normalerweise findet man nur geringe Konzentrationen an Coumestanen in der Pflanze, hauptsächlich in der Wurzel (WONG, 1975; MORANDI et al., 1984; SHERWOOD et al., 1970). Extrinsische Faktoren können diese Situation jedoch deutlich ändern. BICKOFF et al. (1967) konnten nachweisen, daß bei Medicago sativa der Coumestrolgehalt durch den Befall mit Pilzen, Bakterien oder Viren ansteigt. Zahlreiche Autoren berichten von der Induktion der Coumestrol-Akkumulation z.B. bei Befall mit Pflanzenpathogenen wie Pseudomonas phaseolicola (GNANAMANICKAM und PATIL, 1977b; 1979), Rhizoctonia solani (GNANAMANICKAM, 1979), F. solani, Pinicillium patulum oder Phytophthora megasperma (RIZK et al., 1984), Glomus mosseae, Glomus fasciculatus (MORANDI et al., 1984), Xanthomonas campestris (FETT, 1984). Auch eine Induktion der Coumestan-Akkumulation durch abiotische Stressfaktoren ist belegt (KEEN und TAYLOR, 1975; BEGGS et al., 1985; RUBIN et al., 1983).

Während die Induktion der Coumestan-Bildung durch extrinsische Faktoren unumstritten ist, scheint ihre Phytoalexin-Wirkung noch ungeklärt, zumindest wird eine selektive Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen gegenüber Coumestrol berichtet (KEEN und KENNEDY, 1974; GNANAMANICKAM und PATIL, 1977a; FETT und OSMAN, 1982). WEINSTEIN und ALBERSHEIM (1983) postulierten eine allgemeine Interaktion von Coumestrol mit der Bakterienmembran von E. coli und zeigten hier eine Inhibition Membran assoziierter Transportprozesse.

Eine induzierte Akkumulation von Isoflavonoiden und im besonderen von Coumestanen findet man nicht nur bei Samen (RIZK et al., 1984; GNANAMANICKAM, 1979; O'NEILL et al., 1984) und Blättern (LYON und WOOD, 1975; RUBIN et al., 1983; FETT, 1984; KEEN und TAYLOR, 1975), sondern auch bei Zell-Suspensionskulturen von Leguminosen (DIXON und BENDALL, 1978). ROSSITER und BECK (1967) berichten darüberhinaus, daß das Vorkommen einzelner Isoflavonoide auch vom Alter der Pflanze abhängt. Der Reifezustand der Pflanze, ihr Standort, Witterung sowie Düngung bestimmen ebenfalls die Konzentration der Isoflavonoide bei Pflanzen (SACHSE, 1974). Dem beschriebenen Einfluß der Düngung auf den Gehalt an Isoflavonoiden bei Pflanzen (SACHSE, 1974) könnte ein möglicher Effekt von Schwermetallsalzen, wie z.B. von Cadmiumsalzen zugrundeliegen. So wird beispielsweise bei der Düngung mit Klärschlamm oder der Phosphatdüngung dem Boden auch Cadmium zugeführt (KRUSE und LOMMEL, 1979). Die durch Cu^{2+} -Ionen induzierte Akkumulation von Coumestanen bei verschiedenen Pflanzenorganen ist belegt (SHERWOOD et al., 1970; O'NEILL et al., 1984; LYON und WOOD, 1975).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sowohl die Zugabe von biotischen Agentien, vor allem die Applikation von Saccharomyces cerevisiae, aber auch von Metallsalzen (vergl. III.3.7.) zum Kulturmedium bei Phaseolus radiatus Suspensionskulturen eine Steigerung des Wirkstoffgehalts (vergl. III.3.7.). Während die biotischen Agentien in Konzentrationen entsprechend der Literatur (SCHUMACHER et al., 1987) eingesetzt wurden, kann man bei den verwendeten Schwermetallsalz-Konzentrationen davon ausgehen, daß bei Konzentrationen von 10^{-3}M für verwendete Vanadin-, Kupfer- und Cadmiumsalze bereits toxische Effekte auf die kultivierten Pflanzenzellen zu verzeichnen sind.

GRILL et al. (1987) berichten über subletale Konzentrationen verschiedener Metallsalze bei Rauwolfia serpentina Suspensionskulturen. Hier ist für ZnSO_4 eine Konzentration von 1 mM und für MnCl_2 von 2 mM als tolerierter Gehalt der Metallsalze bei dieser Kulturspezies angegeben. Gewiß können für Phaseolus radiatus Suspensionskulturen die Verhältnisse der Toleranz gegenüber diesen Metallsalzen andere sein. Detaillierte Untersuchungen, z.B. das Aufnehmen von Wachstumskurven in Abhängigkeit der gewählten Stressfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht unternommen.

Hier galt es ausschließlich zu ermitteln, ob durch die erzeugten Stress-Situationen im Vergleich mit der Kontrollkultur ohne Belastung der Gehalt aktiver Metabolite gesteigert werden konnte. Bei Zn^{2+} und Mn^{2+} fanden sich mit der Kontrolle (Phaseolus radiatus Suspensionskultur in LS-Medium/vergl. II.1.1.2.) vergleichbare Werte des Coumestrolgehalts (vergl. Abb. 31A), nur geringe Mengen von Isosojagol konnten ermittelt werden (Abb. 31B). Zn^{2+} und Mn^{2+} sind für Pflanze und Tier in geringen Konzentrationen essentiell, z.B. Zn^{2+} für die Aktivität der Carboanhydrase und verschiedener Dehydrogenasen, Mn^{2+} z.B. für Pyruvatcarboxylase und Lactosesynthetase.

Ähnlich ist die Situation bei Applikation von CuSO_4 zum Kulturmedium. Hier wurde nur ein geringer Gehalt an Isosojagol (0,25 mg/g TG) und für Coumestrol nur ein Wert von 1,4 mg/g Trockengewicht erreicht. Cu^{2+} findet man vorwiegend in Proteinen, welche am Transfer von Elektronen beteiligt sind, z.B. der Cytochrom C-Oxidoreductase. Anders ist die beschriebene Wirkung von Cu^{2+} auf die Isosojagol-Akkumulation bei Phaseolus coccineus Keimlingen (O'NEILL et al., 1984). Auch hier wurde eine Konzentration an Cu^{2+} von 10^{-3}M appliziert.

Während die bisher genannten Metallionen in geringen Konzentrationen im Kulturmedium (LINSMAIER und SKOOG, 1965) als essentielle Spurenelemente enthalten sind, findet man weder Vanadin-IV-Oxidsulfat noch Cadmiumnitrat als Salze des Kulturmediums, da sie nicht essentiell sind. Sie werden nur in geringen Konzentrationen von der Pflanze toleriert (vergl. SCHLEE, 1986). Für Rauwolfia serpentina Suspensionskulturen konnte eine subletale Konzentration von 20 μM für VOSO_4 und 100 μM für $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ angegeben werden (GRILL et al., 1987).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten VOSO_4 - und $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -Konzentrationen von 10^{-3}M sind gewiß für die Zellen toxisch. Es ist jedoch offen, wie lange Suspensionskulturen von Phaseolus radiatus solch hohen Konzentrationen dieser Metallionen exponiert werden können. Hier betrug die Dauer der Belastung etwa 40 Stunden. Das Verhältnis von ermitteltem Frischgewicht zu Trockengewicht betrug 10:1 ähnlich wie bei allen anderen untersuchten Agentien sowie der Kontrolle (vergl. Tabelle 29). Die Zellen der Suspensionskultur von Phaseolus radiatus waren wesentlich dunkler (ockergelb) gefärbt. Das von den Zellen abgetrennte Kulturmedium (vergl. II.5.2.) blieb klar, was darauf schließen ließ, daß die Zellen nicht lysiert waren. In wieweit sich eine Zellschädigung in morphologischen sowie biochemischen Effekten manifestierte, wurde nicht detaillierter untersucht. Auffallend ist jedenfalls, daß in diesen Proben der Gehalt beider Coumestane besonders hoch liegt, mit je einem Wert von 4,2 mg/g TG und 11,5 mg/g TG für Coumestrol und 1,3 sowie 8,04 mg/g TG für Isosojagol bei Applikation von jeweils 10^{-3}M VOSO_4 und $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

Zwei grundsätzliche Möglichkeiten der Interpretation dieses Ergebnisses bieten sich zunächst. Einmal die Induktion einer gesteigerten Biosynthese der beiden Coumestane durch An-

schalten oder Abschalten spezifischer Schlüsselenzyme oder einer de novo Synthese entsprechender Enzyme des Phenylpropan-Stoffwechsels. Eine andere mögliche Erklärung wäre eine gesteigerte Aktivität endogener Hydrolasen, wodurch eine vermehrte Freisetzung der entsprechenden Aglyka aus ihrer glykosidischen Bindung resultieren würde.

Um eine mögliche Freisetzung der Coumestane aus glykosidischer Bindung unter dem Einfluß toxischer Schwermetall-Konzentrationen zu klären, wurde eine definierte Menge suspendierter Zellen, die in Anwesenheit von 10^{-3}M Cd^{2+} -Ionen 40 Stunden kultiviert worden waren (vergl. II.1.1.2.), sogleich nach Abtrennen des Kulturmediums für 20 min in siedendem Ethanol (80%) extrahiert. Parallel wurde eine Gewebeprobe zunächst für 48 h bei 37°C inkubiert und nachfolgend in MeOH extrahiert (20 min Ultraschallbad). Die methanolischen Extrakte zeigten um einen Faktor 6 (Mittelwert aus drei Experimenten) höhere Coumestrol-Ausbeuten (HPLC-Analyse entsprechend II.7.3). Um ein Zahlenbeispiel zu nennen: bei einem EtOH-Extrakt (s.o.) aus Zellen, die in Anwesenheit von Cd^{2+} (10^{-3}M) kultiviert wurden, konnten 0,4 mg Coumestrol/g TG bestimmt werden; beim methanolischen Extrakt (s.o.) aus Zellen, welche ohne Belastung kultiviert wurden 1,0 mg Coumestrol/g TG und bei methanolischen Extrakten (s.o.) aus Zellen unter Cd^{2+} -Belastung (10^{-3}M) 4,5 mg Coumestrol/g TG. Damit konnte gezeigt werden, daß nicht ausschließlich eine vermehrte Hydrolyse infolge einer Schwermetall-Intoxikation die gesteigerten Ausbeuten der rezeptoraktiven Coumestane bei Phaseolus radiatus Suspensionskulturen verursachte.

Da sich die Applikation von Cd^{2+} zum Kulturmedium am günstigsten besonders hinsichtlich der Zunahme der Isosojagol-Ausbeute erwiesen hatte, wurde es als extrinsischer Indukter der Coumestan-Akkumulation gewählt. Es konnte eine Abhängigkeit des Effektes von gewählten Cd^{2+} -

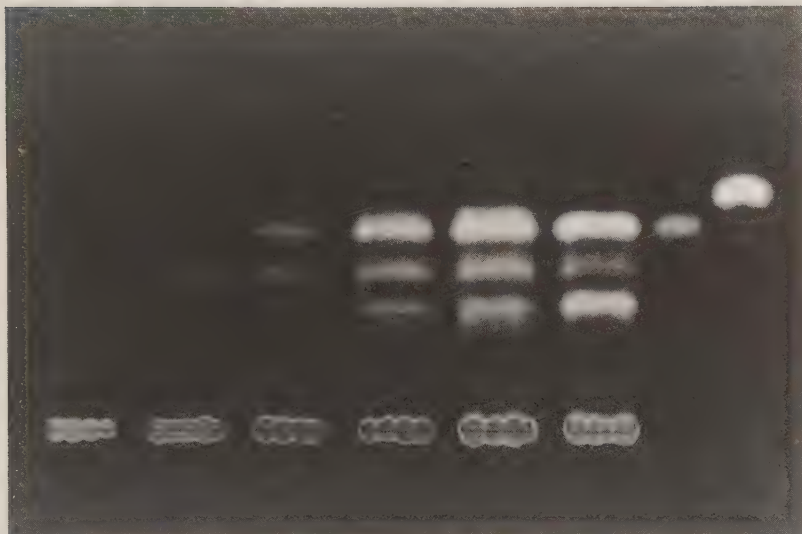


Abb. 56: DC-Analyse methanolischer Extrakte aus autolysiertem Gewebe von Phaseolus radiatus Suspensionskulturen (vergl. II.5.2.). In angegebener Reihenfolge wurden folgende Proben aufgetragen: Kontrolle (ohne Belastung/ 02), 50 μM (12), 100 μM (22), 200 μM (32), 500 μM (42) und 1 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (52) im Kulturmedium, Coumestrol (Referenz) und Isosojagol (Referenz). Applikation des Schwermetallsalzes jeweils 2 d nach Inoculation. Detektion der Banden bei 366 nm. Zur quantitativen HPLC-Analyse vergl. Abb. 33.

Konzentrationen (vergl. Abb.33) beobachtet werden (Abb. 56). Schon bei subletalen Cd^{2+} -Konzentrationen (GRILL et al., 1987) von 100 μM kann der Gehalt an Isosojagol quantitativ bestimmt werden (vergl. Abb.33 B). Die verhältnismäßig geringen Schwankungen des Coumestan-Gehalts bei Ph. radiatus

Suspensionskulturen unter Belastung von 100, 200 und 500 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kann als ein erster Hinweis einer gesteigerten Synthese von Coumestrol und Isosojagol interpretiert werden. Demgegenüber könnte der sprunghafte Anstieg bei einer 1 mM Konzentration von $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ als zusätzliche Aktivität endogener Hydrolasen gedeutet werden (vergl. Abb. 33A).

Auf eine induzierte Biosynthese der Coumestane bei Applikation von $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ verweist die unterschiedlich gebildete Menge an Isosojagol in den Untersuchungen, welche den Abbildungen 31 und 33 jeweils zugrundeliegen. Während bei der Untersuchung der Wirkung biotischer und abiotischer Agentien auf den Gehalt an Coumestanen (Abb. 31) die Applikation der Agentien unmittelbar im Anschluß an die Inoculation (vergl. II.5.3.) erfolgte, wurde zur Untersuchung des Effektes verschiedener $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -Konzentrationen (Abb.33) das Schwermetallsalz erst zwei Tage nach der Inoculation zugeführt, d.h. zu einem späteren Zeitpunkt der Wachstumsphase.

Ebenfalls auf eine gesteigerte Biosyntheserate von Isoflavonoiden durch Wirkung biotischer und abiotischer Agentien bei Suspensionskulturen von Phaseolus radiatus weisen zahlreiche DC- und HPLC-Chromatogramme. Hier konnten im Gegensatz zu Chromatogrammen methanolischer Extrakte aus autolysiertem Gewebe nicht zahlreiche Metabolite in niedrigen Konzentrationen bei 366 bzw. 345 nm detektiert werden, sondern nur wenige Komponenten in relativ hoher Konzentration (vergl. Abb. 32).

Zahlreiche Autoren berichten nicht nur von der Akkumulation von Isoflavonoiden, ad rem Coumestanen nach Infektion oder Applikation von Schwermetallsalzen bei verschiedenen Faba-geen, sondern ebenfalls einem damit verbundenen Anstieg der Biosyntheserate der jeweiligen Isoflavonoide. KEEN et al.

(1972) berichten von der Akkumulation von Hydroxyphaseollin ausschließlich 16-48 h nach erfolgter Inoculation von Phytophthora megasperma beim Hypocotyl von Glycine max. Erst später (nach 48-72 h), nach Einstellen der Akkumulation von Hydroxyphaseollin fanden die Autoren einen Anstieg des Daidzein-, Coumestrol- und Sojagolgehalts. Nach KEEN et al. (1972) bedingt die Akkumulation von Hydroxyphaseollin eine Aktivierung der Isoflavonoid-Biosynthese. Auch andere Autoren (OLESON, 1972; OLAH und SHERWOOD, 1971; WHITEHEAD et al., 1982) berichten von einer gesteigerten Biosynthese von Daidzein und Coumestrol als Folge einer Infektion mit Mikroorganismen bei Medicago sativa und Phaseolus vulgaris.

Die Zunahme des Gehalts an Phaseollin und Coumestrol verletzter Cotyledonen von Ph. vulgaris erfolgte nach zuvor erhöhter Aktivität der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), der Chalkon-Synthase und Chalkon-Isomerase. Bei Behandlung des Gewebes von Hypokotyl und Cotyledonen mit Zellwand-Präparationen von Colletotrichum lindemuthianum konnte bei den Cotyledonen ebenfalls eine gesteigerte Chalkon-Synthase-Aktivität beobachtet werden, während die PAL-Aktivität gehemmt wurde (WHITEHEAD et al., 1982). Es wurde gezeigt, daß Daidzein und Trihydroxychalkon biosynthetische Vorstufen des Coumestrols sind (DEWICK und MARTIN, 1979; BERLIN et al., 1972; BARZ und GRISEBACH, 1966; DEWICK et al., 1970).

Inwieweit in der vorliegenden Arbeit die gesteigerte Akkumulation von Coumestrol und Isosojagol als Folge der Applikation biotischer und abiotischer Agentien bei Phaseolus radiatus Suspensionskulturen mit einer Zunahme der Aktivität involvierter Enzyme korreliert, wäre zu untersuchen, um eindeutig die beobachteten Effekte, besonders bei $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -Zugabe als Elicitorwirkung etikettieren zu können. Allerdings erscheint hier in Übereinstimmung mit der Literatur ein solcher Elicitoreffekt wahrscheinlicher als eine gesteigerte Hydrolyse glykosidisch gebundener Isoflavonoide.

Solche Effekte (Ausnutzung endogener Hydrolasen) wurden bereits bei der Präparation von Coumestrol verwendet (vergl. III.3.5.). Zur Isolation von Strukturen, die nachfolgend noch zu analysieren sind, z.B. im Fall der Isosojagol-Präparation erweist sich darüberhinaus eine Autolyse des Gewebes gegenüber einer sauren Hydrolyse mit HCl günstiger, da nicht bekannt ist, ob vorliegende Strukturen dadurch chemisch verändert werden, z.B. Isosojagol zu Sojagol (s.u./ nachfolgendes Kapitel).

Die gewünschte Zielsetzung, durch Zugabe möglicher Elicitoren eine Akkumulation von Benzodiazepinrezeptor wirksamen Komponenten bei Ph. radiatus Suspensionskulturen zu erhalten, konnte erreicht werden.

- Ist Sojagol ein Sekundärmetabolit bei Phaseolus radiatus ?

In der vorliegenden Arbeit konnte Sojagol (vergl. Abb. 40) ausschließlich in stark gereinigten Fraktionen methanolischer Rohextrakte aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen und nur in äußerst geringen Konzentrationen DC-analytisch detektiert werden. Weder bei Extrakten aus der Suspensionskultur noch der Ph. radiatus Pflanze konnte das Vorkommen von Sojagol HPLC-analytisch belegt werden. Da Isosojagol unter schwach sauren Bedingungen spontan zum Sojagol zyklisiert, ist anzunehmen, daß bei Phaseolus radiatus nicht Sojagol, sondern ausschließlich das 7,12 Dihydroxy-13- (γ,γ -dimethylallyl)-Coumestan vorliegt. Dieses Postulat - Sojagol ein Artefakt? - findet gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Experimentalbefunden.

O'NEILL et al. (1984) isolierten erstmals Isosojagol aus Phaseolus coccineus Keimlingen, die einzigen Autoren die bisher über das Vorkommen von Isosojagol berichten. Auch hier (O'NEILL et al., 1984) wird von einer Zyklisierung des Isosojagol zum Sojagol in saurem Millieu berichtet. Auch hier wurde nicht Sojagol, sondern Isosojagol isoliert. Darüberhinaus ist bemerkenswert, daß die Autoren (O'NEILL et al., 1984) von einer Behandlung der Keimlinge mit CuCl₂ berichten, so daß die Vermutung naheliegt, daß Isosojagol ausschließlich unter dem Einfluß extrinsischer Induktoren bei Phaseolus gebildet wird (vergl. vorangehendes Kapitel/vergl. Abb. 32B).

Bislang wurden in der Literatur nur zwei weitere prenylierte Coumestane beschrieben, das Psoralidin aus Psoralea corylifolia (BAJWA et al., 1972) und das Phaseol aus Phaseolus aureus ROXB. (O'NEILL, 1983), vergl. Abb. 57. Ein dem Sojagol entsprechendes komplexes Coumestan, bei welchem der Dimethylpyran-Ring statt Ring B des Coumestans Ring A substituiert, wurde bisher nicht identifiziert.

Vom Vorkommen des Sojagol bei Soja hispida berichten erstmals ZILG und GRISEBACH (1968). In einer späteren Publikation (KEEN et al., 1972) wird die Spezies revidiert. Sojagol wurde erstmals bei Phaseolus radiatus L. entdeckt (ZILG und GRISEBACH, 1968). Sowohl ZILG und GRISEBACH (1968) als auch KEEN et al. (1972) extrahierten die nachfolgend gereinigten Isoflavonoide jeweils unter sauren Bedingungen aus Phaseolus radiatus Wurzeln bzw. dem Hypocotyl von Glycine max. Es ist von daher durchaus denkbar, daß während der Präparation des Coumestan-Derivats eine Zyklisation zum Sojagol erfolgte, so daß nur noch diese Struktur detektiert wurde. Nur wenige Autoren konnten Sojagol identifizieren (ZILG und GRISEBACH, 1968; BERLIN und BARZ, 1971; KEEN et

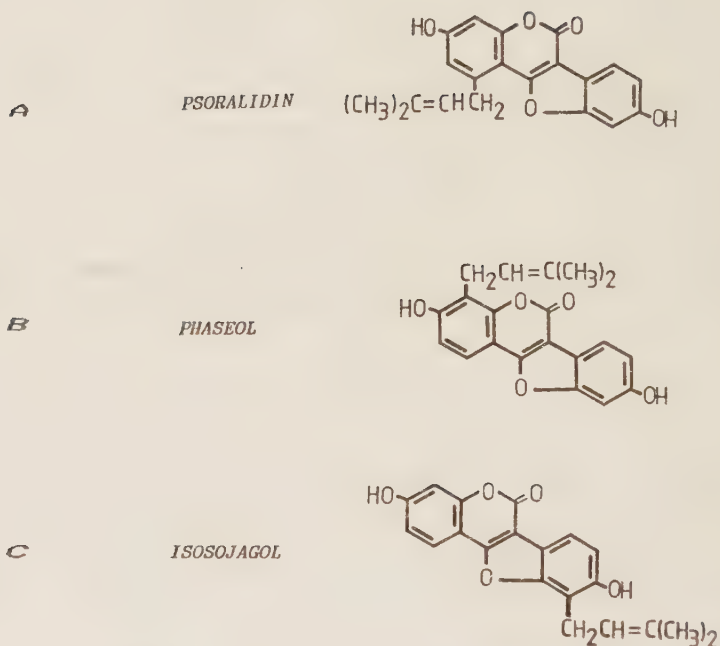


Abb. 57: Bisher beschriebene prenylierte Coumestane.
A: Psoralidin aus *Psoralea corylifolia* (BAJWA *et al.*, 1972).
B: Phaseol aus *Phaseolus aureus* ROXB. (O'NEILL, 1983).
C: Isosojagol aus *Phaseolus occineus* (O'NEILL *et al.*, 1984)

al., 1972; KEEN und KENNEDY, 1974; KEEN und TAYLOR, 1975),
und zwar ausschließlich bei Bohnen, bei *Glycine max* (KEEN *et al.*, 1972; KEEN und KENNEDY, 1974; KEEN und TAYLOR, 1975;) und *Phaseolus radiatus* L., syn. *Ph. aureus* ROXB. (ZILG und GRISEBACH, 1968; BERLIN und BARZ, 1971). Vom Vorkommen des Sojagols bei anderen *Fabaceen*, z.B. *Trifolium* Arten wurde bisher nichts berichtet.

Vorwiegend wird die Akkumulation von Sojagol als Folge einer Stresssituation beobachtet, z.B. bei Ozon-Schädigung (KEEN und TAYLOR, 1975), bei Inoculation mit Pseudomonas glycinea (KEEN und KENNEDY, 1974) der Blätter und bei Infektion mit Phytophthora megasperma des Hypokotyls von Glycine max (KEEN et al., 1972). Bei Phaseolus aureus ROXB. Pflanzen, welche auf dem Freiland kultiviert wurden, konnte Sojagol aus der Wurzel gewonnen werden (ZILG und GRISEBACH, 1968). BERLIN und BARZ (1971) fanden es erstmals bei Zellkulturen von Phaseolus aureus ROXB. nach längerer Zeit der Kultivierung. Dies könnte in besonderer Weise daraufhindeuten, daß auch hier nicht Sojagol, sondern Isosojagol ein bei Ph. radiatus L. vorkommendes Coumestan-Derivat darstellt. Es ist jedenfalls auffallend, daß auch Isosojagol nur durch Induktion mit biotischen und abiotischen (O'NEILL et al., 1984) Agentien in ausreichenden Mengen isoliert werden kann.

Im Vergleich mit anderen Isoflavonoiden ist Sojagol nur in jeweils äußerst geringen Konzentrationen (vergl. Abb.58) nachgewiesen worden (ZILG und GRISEBACH, 1968; KEEN et al., 1972). Über seine Biosynthese ist nichts bekannt (Abb.59), während für die Coumestan-Biosynthese belegt ist, daß Isoflavone biosynthetische Vorstufen (GRISEBACH und BARZ, 1963) darstellen. Z.B. konnte Daidzein als ein Intermediat der Coumestrol-Biosynthese durch Markierungsexperimente bei verschiedenen Leguminosen identifiziert werden (BARZ und GRISEBACH, 1966; ZILG und GRISEBACH, 1968). Eine Dimethylallyl-Substitution in Position 13 eines isolierten Coumestan-Derivats wird 1968 von ZILG und GRISEBACH als eine alternative Struktur des Sojagols anhand von NMR-Protonenspektren diskutiert. Nicht nur die Identifizierung des Isosojagols (O'NEILL et al., 1984), sondern ebenfalls die Interpretation der NMR-Protonenspektren des Phaseols (O'NEILL, 1983) wurden anhand einer sauren Zyklisierung des

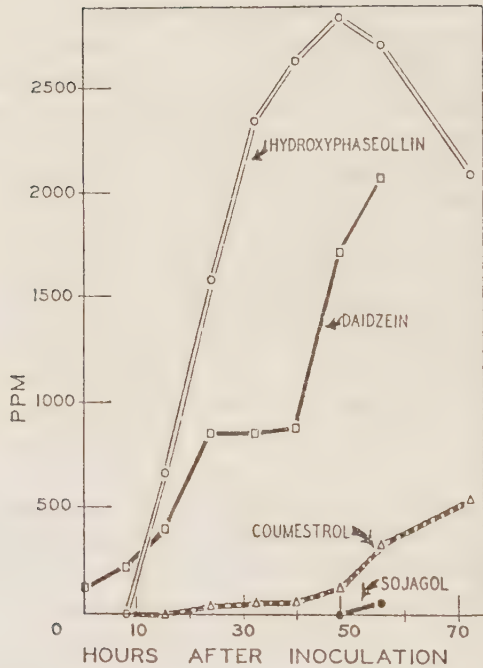


Abb. 58: Konzentrationen von Isoflavonoiden zu verschiedenen Zeiten nach Inoculation des Hypokotyls von Glycine max durch Phytophthora megasperma (KEEN et al., 1972)

in Position 8 prenylierten Derivats vorgenommen. Im letztgenannten Fall wurde jedoch ein komplexes Coumestanderivat mit einem Dimethylpyran-Ring bei Ph. aureus Keimlingen ebenfalls nicht als Sekundärmetabolit nachgewiesen.

Ein möglicher Grund für das Vorkommen von Sojagol bei der Pflanze, aber das Fehlen analoger Strukturen, welche eine Prenylierung des A-Rings zeigen, könnte das Vorkommen der Coumestane in glykosidischer Bindung sein, z.B. isolierte LE-VAN 1984 ein 7- β -Glukosid des Coumestrols, welches als Coumestrin bezeichnet wurde. Ähnlich sind Isoflavonoid-Glykoside, bei welchen die Glykosidierung in Position 7 der Coumestan-Struktur vorliegt beschrieben, z.B. das Desmethyl-Wedelolacton-7-O-Glukosid (INGHAM, 1983). Eine solche Maskierung der Hydroxylgruppe bevorzugt in Position 7 würde das fehlende Vorkommen einer Dimethylpyran-Struktur am Ring A von Coumestanen erklären können. Inwieweit solche prenylierten Derivate bei Präparationen, d.h. nach Hydrolyse der glykosidischen Bindung stabil sind, wäre bei dieser Interpretation eine berechnigte Frage.

Bleibe die Möglichkeit, daß prenylierte Coumestan-Strukturen je nach pH des Zellkompartiments in einem Gleichgewicht mit der zyklischen coexistieren. Eine mögliche Biosynthese des Sojagols via Isosojagol kann jedenfalls als wahrscheinlich angenommen werden, falls Sojagol ein Sekundärmetabolit und kein Artefakt bei der Präparation von Isoflavonoiden bei Leguminosen darstellt. Vom biosynthetischen Standpunkt her erscheint die Bezeichnung Prosojagol wesentlich angemessener als Trivialname für das 7,12 Dihydroxy-13-(γ , γ -dimethylallyl)-Coumestan als die von O'NEILL et al. (1984) gewählte Bezeichnung Isosojagol.

- Östrogenität und Benzodiazepinrezeptor-Aktivität von Isoflavonoiden

"In the case of benzodiazepine recognition site, there is a further problem to be addressed when the relationship between structure and biological activity is considered. This concerns the diversity of compounds, each with a quite distinct chemical structure, which appear to recognise the same site as the classical benzodiazepines." (MARTIN, 1987) In der Tat wird von einer Fülle von strukturell recht unterschiedlichen Verbindungen berichtet (NUTT, 1988), welche eine deutliche Affinität zum Benzodiazepinrezeptor zeigen. Neben den Benzodiazepinen wie Clonazepam oder Flunitrazepam besitzen auch die β -Carboline, z.B. β -Ethyl-Carbolin-3-Carboxylat (β -CCE/ PATEL et al., 1981) und das 3- (Methoxycarbonyl) -Amino - β -Carbolin (β -CMC / PRADO de CARVALHO et al., 1986) eine ausgeprägte Affinität zum Benzodiazepinrezeptor. Darüberhinaus findet man Liganden wie Zopiclon (BLANCHARD et al., 1983), Pyrazalopyridine (WILLIAMS, 1984) und Quinoline (GARDNER et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit konnte die Klasse an Benzodiazepinrezeptor affinen Strukturen mit den Isoflavonoiden erweitert werden. Wie die Beispiele aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit darlegen, ist die These vom "Drug Design" (SCHWERTHÖFER, 1987) als ausschließlichem Weg moderner Arzneistoff-Entwicklung äußerst eingeschränkt gültig, da bisher nicht unbedingt "maßgeschneiderte Substanzen" (SCHWERTHÖFER, 1987) eine definierte Wirkqualität besitzen. Abb. 60 zeigt einige Beispiele für Benzodiazepinrezeptor-Liganden äußerst heterogener Struktur.

Neben der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen antimikrobiellen Wirkung von Isoflavonoiden bzw. Coumestanen werden auch hepatotrope Eigenschaften (WAGNER et al., 1986), potente

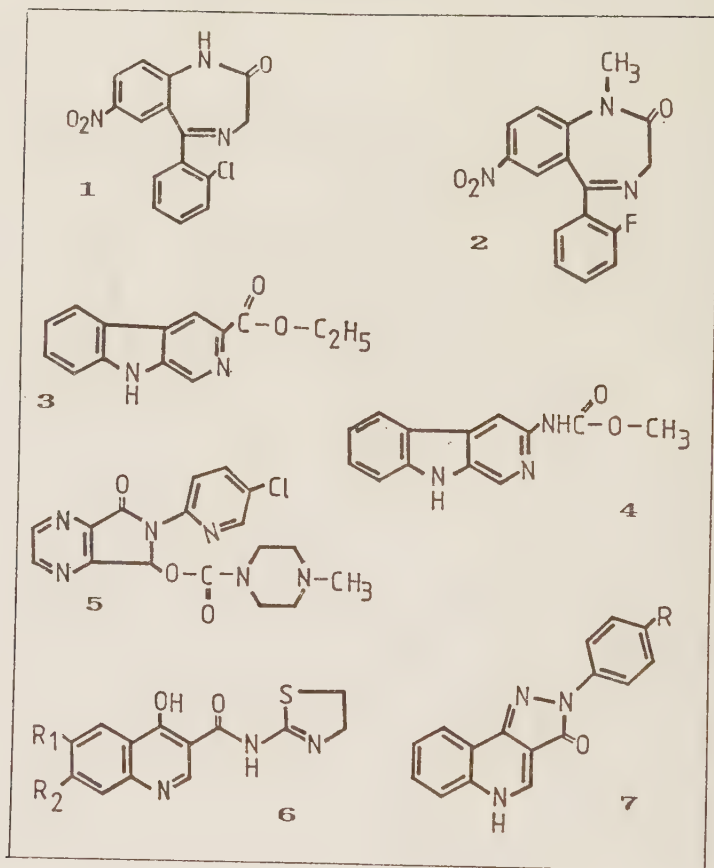


Abb. 60: Benzodiazepinrezeptor-Liganden: Benzodiazepine Clonazepam (1) und Flunitrazepam (2); β -Carboline β -Ethyl-Carbolin-3-Carboxylat ($\equiv$ β -CCE/3) und 3-(Methoxycarbonyl)-Amino- β -Carbolin ($\equiv$ β -CMC/4); Zopiclon (5); Quinoline (mit R₁ = OC₂H₅, OCH₃, H oder Cl; R₂ = H oder Cl/6) und die Pyrazalopyridine (mit R = H, Cl oder OCH₃/7); zur Literatur vergl. Text

Entzündungsinhibition (WAGNER und FESSLER, 1986), aber vor allem eine ausgesprochen östrogene Wirkung (NELSON et al., 1984; LEE et al., 1977) bei Vertretern der Isoflavonoide beschrieben. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Coumestrol im Östrogenrezeptor-Bindungsassay (NELSON et al., 1984) zeigte eine hohe Spezifität der Wirkung, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit eine ausgeprägte Benzodiazepinrezeptor-Aktivität belegt ist.

Ein fundamentales Problem ist einerseits gegeben, indem der Benzodiazepinrezeptor Liganden recht unterschiedlicher Struktur besitzt, andererseits eine definierte Struktur bzw. Substanzklasse unterschiedliche Wirkqualitäten zeigt. Dadurch stellt sich die Frage, inwieweit ist der jeweilige Effekt spezifisch, inwieweit korreliert hier im besonderen eine östrogene Eigenschaft bestimmter Isoflavonoide mit ihrer Benzodiazepinrezeptor-Aktivität.

Benzodiazepinrezeptor-Liganden besitzen unterschiedliche Wirkqualitäten, sie können die Eigenschaft eines Agonisten, partiellen Agonisten, Antagonisten oder inversen Agonisten besitzen, z. B. sind Benzodiazepine wie Clonazepam klassische Agonisten mit antikonvulsiven, anxiolytischen und tranquillisierenden Eigenschaften. Das β -Carbolin β -CCE ist bekannt als ein inverser Agonist mit konvulsiver und anxiogener Wirkung (BRÆSTRUP et al., 1983), während β -CMC nur die sedative Wirkung der Benzodiazepin-Agonisten antagonisiert (PRADO de CARVALHO et al., 1986). Zahlreiche weitere Beispiele ließen sich ergänzen (vergl. NUTT, 1988). Die Frage nach den molekularen Mechanismen solch unterschiedlicher Wirkqualitäten verschiedener Liganden des Benzodiazepinrezeptors stellt sich, z.B. die Interaktion der Liganden mit verschiedenen Bindungsdomänen des Rezeptors. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (vergl.I.) ist der Benzodiazepinrezeptor funktionell eng mit dem GABA-Rezeptor assoziiert (vergl.Abb. 61).

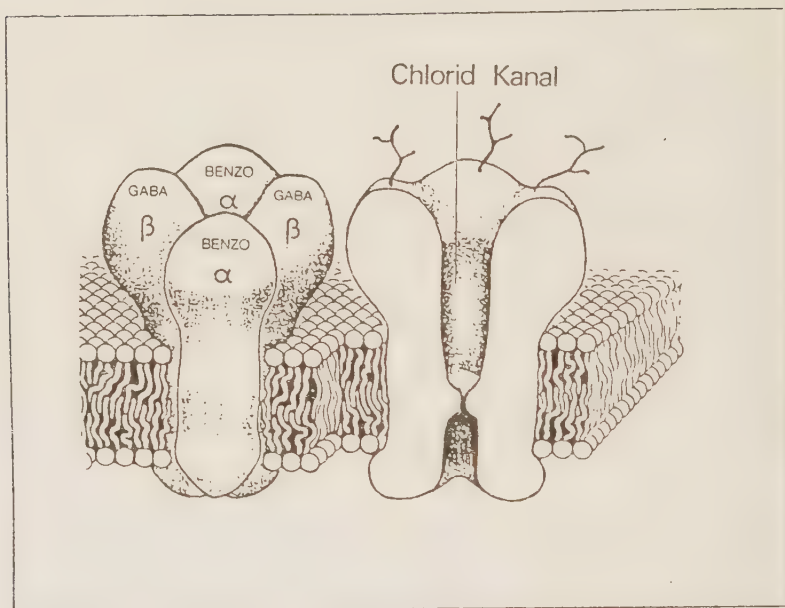


Abb. 61: Modell des GABA/Benzodiazepin-Rezeptor-Komplexes (aus einer Broschüre der HOFFMANN-LA ROCHE AG: "Ein Blick hinter die Kulissen der Roche-Forschung". Abgebildet ist der GABA/Benzodiazepin-Rezeptor-Komplex, eingebettet in die Membran, bestehend aus α - und β -Einheiten bzw. Bindungsstellen für Benzodiazepine und GABA. Der gesamte Komplex bildet einen Chloridionen-Kanal. Kohlenhydrat-Anteile sind als verzweigte Linien markiert.

Liganden, welche an die Domäne der Benzodiazepine binden und die Konformation des GABA-Rezeptors derart beeinflussen, daß seine Affinität für GABA zunimmt, werden als Agonisten

bezeichnet; entsprechend wären antikonvulsive, anxiolytische und tranquillisierende Wirkqualitäten typisch. Liganden, welche bei Bindung des Benzodiazepinrezeptors den GABA-bindenden Teil allosterisch modulieren, so daß die GABA-Affinität zur GABA-Domäne abnimmt, zeigen als Antagonisten keine Wirkung oder nur eingeschränkt die ein oder andere Wirkqualität des Agonisten. Dazwischen gibt es zahlreiche Abstufungen der Wirkqualität von Liganden, vom partiellen Agonisten bis zum inversen Agonisten (s.o.). Dies ist eine äußerst vereinfachte Vorstellung der Benzodiazepin-Wirkung, welche die multiplen Möglichkeiten der Bindung von Liganden an einer dieser Domänen ungeachtet läßt (vergl. BIGGIO und COSTA, 1983).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isoflavonoide wurden ausschließlich auf ihre Eigenschaft als Verdränger der Radioligandbindung im Rezeptorassay untersucht, ungeachtet einer möglichen kompetitiven Verdrängung und der Wirkqualität. Bei äußerst spezifischen Liganden wie z.B. Coumestrol und Isosojagol konnte keine spezifische Verdrängung bei einem weiteren Rezeptor, hier im Opiatrezeptorassay ermittelt werden. Somit kann die Bindung dieser Substanzen an Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor nicht als Reaktion einer allgemein stark proteinaffinen Struktur gedeutet werden. Eine Ermittlung der Kompetitivität der Verdrängung einzelner aktiver Isoflavonoide könnte eine Struktur-Wirkungs-Beziehung eindeutig wiedergeben, da bei vorliegenden Untersuchungen weder belegt ist, ob [^3H]FLU kompetitiv von einem definierten Isoflavonoid verdrängt wurde, ob alle eingesetzten Isoflavonoide an derselben "recognition site" binden, ob [^3H]Östradiol kompetitiv verdrängt wird oder nicht und ob alle aktiven Isoflavonoide an derselben Stelle des Östrogenrezeptors angreifen. Eine Korrelation der Verdrängung des Radioliganden von Benzodiazepin- und Östrogenrezeptor kann nur dann definierten Strukturmerkmalen zugeordnet werden,

wenn sie an dem jeweiligen Rezeptor jeweils gleiche Bindungsstellen aufweisen.

Betrachtet man Benzodiazepinrezeptor aktive Isoflavonoide, so stellt man fest, daß Coumestane die aktivste aller getesteten Isoflavonoid-Klassen darstellen, z.B. beim Vergleich von Coumestrol mit Daidzein (Tabelle 31). Ähnlich ist die Beziehung östrogener Isoflavonoide im Östrogenrezeptortest. Auch hier sind die Coumestane die aktivsten, z.B. Coumestrol und Daidzein zeigen ähnlich wie beim Membranrezeptor auch beim Östrogenrezeptor tendentiell ähnliche Unterschiede der Rezeptoraffinität (Tabelle 31). Für einige Derivate, z. B. Isosojagol, (+/-)Medicarpin, Daidzein und dem Flavon Apigenin konnte eine gute Korrelation von Östrogen- und Benzodiazepinrezeptor-Aktivität ermittelt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß diese Derivate jeweils an verschiedenen Bindungsstellen der beiden Rezeptoren binden, so daß eine Interpretation dieser Struktur-Wirkungs-Korrelation ohne zusätzliche Ermittlungen hinsichtlich möglicher gleicher Bindungsstellen unzureichend ist.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie (III.4.) ist jedoch hinsichtlich der Diskussion über mögliche endogene Liganden des Benzodiazepinrezeptors und der Rezeptorfunktion (vergl. Kapitel I.) interessant. Steroidhormon-Metabolite werden als Barbiturat ähnliche Modulatoren des GABA-Rezeptors beschrieben (MAJEWSKA et al., 1986). Progesteron und Deoxycorticosteron hemmen in Konzentrationen zwischen 10^{-7} und 10^{-5} M die Bindung des konvulsiv wirkenden t-Butyl-Bicyclophosphorothionat am GABA-Rezeptor-Komplex und steigern die Bindung von Flunitrazepam (MAJEWSKA et al., 1986).

HAEFELY (1983) beschreibt die modulatorischen Effekte einzelner Untereinheiten des GABA-Effektorsystems und stellt ein

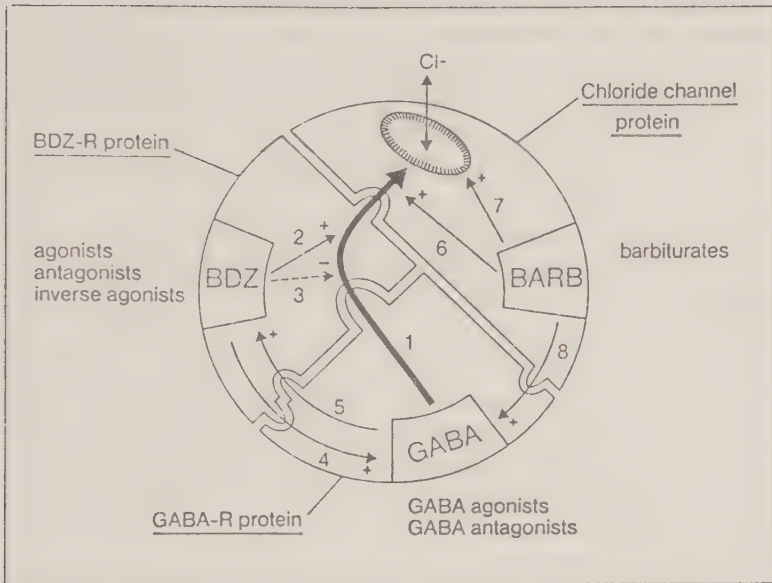


Abb. 62: Hypothetisches Modell der Wirkung des GABA-Rezeptor - Benzodiazepin - Rezeptor - Chloridkanal - Komplexes (HAEFELY, 1983). Der Komplex besteht aus dem GABA-Rezeptor (GABA-R-Protein), dem Benzodiazepin-Rezeptor (BDZ-R-Protein) und dem Chlorid-Kanal-Protein mit der Bindungsdomäne für Barbiturate. Pfeil 1: Aktivierung des GABA-Rezeptors öffnet den Chlorid-Ionen-Kanal und steigert die Bindung für Benzodiazepin-Agonisten (Pfeil 5). Benzodiazepin-Agonisten fördern die Kopplungsfunktion (Pfeil 2) und steigern die Affinität von GABA-Agonisten zum Rezeptor (Pfeil 4). Inverse Agonisten reduzieren die Koppelungsfunktion des Benzodiazepin-Rezeptors (Pfeil 3). Barbiturate verändern die Kinetik des Chloridionen-Kanals (Pfeil 6) in hohen Konzentrationen direkt (Pfeil 7) und steigern die Affinität des GABA-Rezeptors (Pfeil 8).

hypothetisches Modell des GABA-/Benzodiazepin-Rezeptor-Chloridkanal-Komplexes mit einer Bindungsdomäne für Barbiturate vor (Abb.62). Eine Veränderung der Kinetik des Chlorid-Ionen-Kanals, und eine gesteigerte Affinität des GABA-Rezeptors durch Barbiturate werden belegt. In hohen Konzentrationen öffnen Barbiturate direkt den Chlorid-Ionen-Kanal. Für die Isoflavonoide wurde nicht ermittelt, an welcher der in der Literatur beschriebenen Bindungsdomänen sie angreifen. Es wäre interessant, ob östrogen wirksame Isoflavonoide, besonders Coumestane ähnlich wie Steroidmetabolite eine Affinität zur Barbiturat-Domäne des Rezeptor-Komplexes aufweisen.

In diesem Zusammenhang scheint erwähnenswert, daß während der Menopause sowie postnatal - also jeweils bei Absinken des Östrogenspiegels- bei Frauen häufig psychische Symptome, z.B. Schlafstörungen, nervöse Erschöpfungszustände, Stimmungslabilität und Angstgefühle auftreten (SCHNEIDER, 1982). Zu den Charakteristika menopausaler Hormonveränderungen gehört neben dem Absinken des Östrogenspiegels, ein niedriger Progesteronspiegel sowie ein Fehlen zyklischen Progesteronanstiegs (HERRMANN, 1982). Steroidhormone hemmen die Wirkung noradrenerger Neurone via opioidder Peptide. Bei Mangel an Sexualhormonen werden vermindert opioide Peptide gebildet, was z.B. das Auftreten depressiver Zustände erklären könnte (Prof.Dr. Neumann, persönliche Mitteilung). Häufig findet man in der Therapie menopausaler Beschwerden neben einer Östrogen-Substitution die Verwendung von Benzodiazepinen (HUSSLEIN, 1971; WILLIAMS, 1971) ebenso beim prämenstruellen Syndrom (REID, 1982) und der Dysmenorrhoe (LAURITZEN, 1982).

Umgekehrt werden bei Benzodiazepinen Wirkqualitäten wie Ovulationshemmung (PURSHOTTAM et al., 1961), Menstruationsstörungen (MIURA, 1980; JIZUKA et al., 1973) und eine

Inhibition der Libido (VOGT und POELDINGER, 1982; BUFFUM, 1982) bei Langzeit-Therapie oder hoher Dosierung beschrieben. Inwieweit hier systemische bzw. funktionelle Mechanismen, z.B. auf der Ebene der Neurotransmitter (POLLACK und ROSENBAUM, 1987; WILKINSON et al., 1980; BUTTAR, 1980) oder des Arzneistoff-Metabolismus (MARINO et al., 1976; HEMPEL und KLINGER, 1976) grundlegend für solche Nebenwirkungen der Benzodiazepine sind, ist offen.

Für die vorliegenden Experimental-Befunde einer Östrogen- und Benzodiazepinrezeptor-Affinität von Isoflavonoiden bzw. im besonderen von Coumestrol und Isosojagol wäre aufgrund dieser Problematik gewiß die Kenntnis der spezifischen "recognition site" (MARTIN, 1987) der Isoflavonoide am jeweiligen Rezeptor interessant.

In vivo Experimente sind für erste Hinweise einer Benzodiazepin-Wirkung bzw. der Wirkqualität unerläßlich. Eine hohe in vitro Affinität zu cerebralen Benzodiazepin-Rezeptoren wurde kürzlich für das natürlich vorkommende Biflavonoid Amentoflavon gezeigt (NIELSEN et al., 1988). Die i.v. Applikation von Amentoflavon zeigte jedoch keine Inhibition der [³H]FLU-Bindung am Benzodiazepin-Rezeptor bei der Maus in vivo (NIELSEN et al., 1988). Ausgehend von der Beobachtung (BENNETTS und UNDERWOOD, 1951; BENNETTS und CURNOV, 1952), daß Isoflavonoide des Klees bei weidenden Schafen zu Fruchtbarkeitsstörungen führten, kann man schließen, daß im Gegensatz zum Amentoflavon (NIELSEN et al., 1988) Coumestrol aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften und seinem geringeren Molekulargewicht ZNS gängig ist und so nicht nur eine östrogene, sondern möglicherweise auch eine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität in vivo entfalten kann. Es bleibt die Frage,

"wozu" Stoffe "wirken" und "wie" Stoffe "wirken".

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsassays wurden am Lehrstuhl etabliert. Auch für den cytoplasmatischen Östrogenrezeptor wurde ein Rezeptor-Bindungsassay aufgebaut.

2. Methanolische Extrakte von mehr als 500 Kallusspezies der Lehrstuhlsammlung wurden in den Opiat- und Benzodiazepinrezeptor-Bindungsstudien untersucht. Für Spezies mit hohen Verdrängungsraten der jeweiligen Radioliganden [^3H]Naloxon sowie [^3H]Flunitrazepam wurde im entsprechenden Rezeptor-Bindungsassay eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit ermittelt.

3. Eine Opiatrezeptor aktive Komponente wurde einer chromatographisch nachweisbaren Komponente bei Bocconia cordata Zellkulturen zugeordnet und der Opiatrezeptor aktive Metabolit aus Suspensionskulturen von Bocconia cordata isoliert. Mit Hilfe massenspektroskopischer Methoden und anhand von NMR- ^1H -Spektren wurde Sanguinarin als Opiatrezeptor aktive Komponente bei Bocconia cordata Suspensionskulturen identifiziert.

4. Für Sanguinarin wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung im Opiatrezeptor-Bindungsassay nachgewiesen. Die Opiatrezeptoraktivität von Sanguinarin wurde hier erstmals beschrieben und eine IC_{50} von $5,8 \times 10^{-6}\text{M}$ ermittelt.

5. Bei Zellkulturen von Phaseolus radiatus wurde eine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität nachgewiesen und drei chromatographisch nachweisbaren Komponenten zugeordnet.

6. Es wurde durch DC- und HPLC-Analyse gezeigt, daß die aktiven Metabolite bei Phaseolus radiatus Suspensionskulturen in glykosidischer Bindung vorliegen. Sowohl durch die Aktivität einer β -Glukosidase als auch endogener Hydro-lasen konnten die glykosidischen Bindungen gespalten werden.

7. Zunächst wurde eine der Benzodiazepinrezeptor aktiven Komponenten aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen isoliert. Durch Massenspektroskopie, NMR- ^{13}C -Spektren und ^1H -Spektren wurde Coumestrol als Benzodiazepinrezeptor aktiver Metabolit identifiziert. Eine Zuordnung der C-Atome, die direkt mit Protonen verknüpft sind, wurde in einem ^1H - ^{13}C -Hetcor-Spektrum vorgenommen. Eine Zuordnung der quaternären C-Atome war durch ^1H - ^{13}C -long-range-Hetcor-Spektren möglich.

8. Die Quantifizierung des Wirkstoffgehalts und Trennung von aktiven Sekundärmetaboliten in Extrakten aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen wurde durch Ermittlung geeigneter Gradienten für die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie erreicht.

9. Durch Applikation biotischer und abiotischer Agentien wurde eine Akkumulation der Benzodiazepinrezeptor aktiven Metabolite bei Ph. radiatus Suspensionskulturen erreicht. Ein Zusatz von $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ zum Kulturmedium (Endkonzentration 10^{-3}M) verbesserte für Coumestrol die Ausbeute von 50 μg pro g TG auf 11,5 mg/g TG; der Gehalt eines weiteren Benzodiazepinrezeptor aktiven Metaboliten (WK2) wurde quantifizierbar; 8 mg/g TG konnten durch $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -Zusatz HPLC-analytisch bestimmt werden.

10. WK2 wurde isoliert und ihre Struktur durch Massenspektroskopie sowie NMR- ^{13}C - und ^1H -Spektren aufgeklärt. WK2 konnte als Isosojagol identifiziert werden. Die Ermittlung der Position des Prenylrestes dieses Coumestans in Position C-13 war durch die Aufnahme von 2D-long-range- ^1H - ^1H -Cosy-Spektren möglich. Isosojagol wurde erstmalig bei Zellkulturen von Ph. radiatus nachgewiesen. Es wurde damit zum zweiten Mal in der Natur vorkommend bei der Gattung Phaseolus beschrieben.

11. 2D-long-range- ^1H - ^1H -Cosy-Spektren belegten eindeutig die spontane Zyklisation des Isosojagols zum Sojagol. Da Sojagol bei Phaseolus radiatus DC- und HPLC-analytisch nicht nachgewiesen werden konnte, wurde postuliert, daß Sojagol ein Artefakt der Präparation von Isosojagol aus Phaseolus radiatus Suspensionskulturen ist.

12. Erstmals wurden Coumestrol und Isosojagol als Benzodiazepinrezeptor aktive Strukturen nachgewiesen. Damit wurde mit NIELSEN et al. (1988) erstmalig belegt, daß auch nicht Stickstoff enthaltende Naturstoffe eine signifikante Affinität zum Benzodiazepinrezeptor zeigen. Für Coumestrol wurde eine IC_{50} von $4,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ und für Isosojagol eine IC_{50} von $1,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ermittelt, während für das Benzodiazepinderivat Clonazepam die IC_{50} $1,9 \times 10^{-9} \text{ M}$ betrug.

13. Weitere Isoflavonoide zeigen ebenfalls eine Benzodiazepinrezeptor-Aktivität, namentlich Wedelolacton, Demethyl-Wedelolacton, Demethyl-5-dehydroxy-Wedelolacton, 5-Dehydroxy-Wedelolacton und Demethyl-7-Ethyl-Wedelolacton. Das Pterocarpin (+/-) Medicarpin, das Isoflavon Daidzein und das Flavon Apigenin verdrängen dosis abhängig den Radioliganden am Benzodiazepinrezeptor. Dies wurde erstmalig belegt.

14. Die Coumestane Coumestrol, Isosojagol und Demethyl-5-Dehydroxy-Wedelolacton besitzen eine ausgesprochen signifikante Östrogenrezeptor-Aktivität. Die Verdrängung von [^3H]Östradiol durch Lupinalbin A und weitere Isoflavonoide wurde im Östrogenrezeptor-Bindungsassay ermittelt. (+/-) Medicarpin, (-) Maackiain zeigen eine schwache, Daidzein, Genistein und Lupinalbin A eine signifikante Affinität zum Östrogenrezeptor. Das Flavon Apigenin verdrängt im Östrogenrezeptor-Bindungsassay [^3H]Östradiol konzentrationsabhängig. Neben Coumestrol wurde auch für Isosojagol, Demethyl-5-Dehydroxy-Wedelolacton, (+/-)Medicarpin, Daidzein und Apigenin eine positive Korrelation der Östrogen- und Benzodiazepinrezeptor-Aktivität ermittelt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, R.J.: The Positive Inotropic Action of Sanguinarine, Ph.D. Dissertation. University of Arkansas for Medicinal Sciences. Little Rock, Arkansas (1978)
- ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D., ROBERTS, M.F.: Aspects of Alkaloid Production by Plant Cell Cultures. IN: Secondary metabolism in Plant Cell Culture. Morris, P., Scragg, A.H., Stafford, A., Fowler, M.W. (eds.). Cambridge University Press (1986) 1-14
- ANISIMOV, M.M., CIRVA, V.J.-A.: Die biologische Bewertung von Triterpenglykosiden. Pharmazie 35 (1980) 739-744
- APPLEBY, C.A.: A role for Haemoglobine in Cell of Plant Roots. Plant. Cell. Environment 11 (1988) 355-361
- ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassays for the Determination of the Indole Alkaloids Ajmalicine and Serpentine in Plants. Planta medica 34 (1978) 37-46
- ARENS, H., BORBE, H.O., ULBRICH, B., STÖCKIGT, J.: Detection of Pericine a New CNS Active Indole Alkaloid from Picralima Cell Suspension Culture by Opiate Receptor Binding Studies. Planta Medica 46 (1982) 210-214
- ARENS, H., FISCHER, S., LEYCK, A., ROMER, A., ULBRICH, B.: Anti-Inflammatory Compounds from Plagiorhegma dubium Cell Culture. Planta Medica 1 (1985) 52-56
- ARENS, H., ULBRICH, B., FISCHER, H., PARNHAM, M.J., ROMER, A.: Novel Anti-Inflammatory Flavonoids from Podophyllum versipelle Cell Culture. Planta Medica 6 (1986) 468-473
- ARIENS, E.J.: Receptors from Fiction to Fact. Trends Pharmacol. Sci. 1 (1979) 11-15
- BAILEY, R.W., BOURNE, E.J.: Colour Reaktionen Given by Sugars and Diphenylamine-Aniline Spray Reagents on Paper Chromatograms J. Chromatog. 4 (1960) 206-213
- BAJWA, B.S., KHANNA, P.L., SESHADRI, T.R. : New Chromenochalcone Bavachromene from the Seeds of Psoralea corylifolia. Curr. Sci. 41 (1972) 814-815

- BALANDRIN, F.M., KLOCKE, E.S., WURTELE, E.S., BOLLINGER, W.H.: Natural Plant Chemicals: Source of Industrial and Medicinal Materials. Science 228 (1985) 1154-1160
Development of Lacifer cells in Callus Cultures of Calotropis procera AIT. R.Br. Plant Cell Rep. 3 (1984) 206
- BARZ, W., GRISEBACH, H.: Biogenesis of Isoflavones . XIV. Conversion of Daidzen into Alfalfa Isoflavonoids. Z. Naturforsch. 21b (1966) 1113-1114
- BEGGS, C.J., STOLZER-JEHLE, A., WELLMANN, E.: Isoflavonoid Formation as an Indicator of UV Stress in Bean (Phaseolus vulgaris L.) Leaves. The Significance of Photorepair in Assessing Potential Damage by Increased Solar UV-B Radiation. Plant Physiol. 79 (1985) 630-634
- BENNETTS, H.W., CURNOW, D.H.: Estrogenic hormones in Plant in Relation to animal physiology. Proc. 6th Intern. Grassland Congr. (1952) 1237-43
- BENNETTS, H.W., UNDERWOOD, E.J.: The estrogenic Effects of Subterranean Clover (Trifolium subteraneum). Uterine maintenance in the ovariectomized ewe on Clover Grazing. Austrial J. Exp. Biol. Med. Sci. 29 (1951), 249-253
- BERLIN, J.: Naturstoffe aus pflanzlichen Zellkulturen. Chemie in unserer Zeit 17 (1983) 77-84
- BERLIN, J.: Formation of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells and its Impact of Pharmacy. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.4 Medicinal and Aromatic Plants I. Bajaj, Y.P.S. (ed.). Springer, Berlin, Heidelberg (1988) 37-59
- BERLIN, J., BARZ, W.: Metabolism of Isoflavones and Coumestanes in Cell and Callus Suspension Cultures of Phaseolus aureus. Planta 98 (1971) 300-314
- BERLIN, J., SASSE, F.: Selection and Screening Techniques for Plant Cell Cultures. Adv. Biochem. Eng. 31 (1985) 99-132
- BERLIN, J., DEWICK, P.M., BARZ, W., GRISEBACH, H.: Biosynthesis of Coumestrol in Phaseolus aureus. Phytochemistry 11 (1972) 1689-1693
- BICKOFF, E.M., BOOTH, A.N., LYMAN, R.L., LIVINGSTON, A.L., THOMPSON, C.R., KOHLER, G.O.: Isolation of a New Estrogen from Landino Clover. J. Agr. Food Chem. 6 (1958), 536-539

- BICKOFF, E.M., LOPER, G.M., HANSON, C.H., GRAHAM, J.H., WITT, S.C., SPENCER, R.R.: Effect of Common Leafspot on Coumestans and Flavones in Alfalfa. *Crop. Sci.*, 1 (1967) 259-261
- BICKOFF, E.M., SPENCER, R.R., WITT, S.C., KNUCKLES, B.E.: Studies on the Chemical and Biological Properties of Coumestrol and Related Compounds. *Tech. Bull. No. 1048*, US Department of Agriculture (1969)
- BIGGERS, J.D.: In: *The Pharmacology of Plant Phenolics*. Fairbrain, J.W. (ed.). Academic Press London (1959) 51-69
- BIGGIO, G., COSTA, E.: Benzodiazepine Recognition Site Ligands: Biochemistry and Pharmacology. Raven press New York (1983)
- BLANCHARD, J.C., BOIREAU, A., JULOU, L.: Brain Receptors and Zopiclone. *Int. Pharmacopsychiatry* 17 (1983) 59-69
- BLASKO, G., CORDELL, G.A., BHAMARAPRAVATI, S., BEECHER, C.W.W.: Carbon ^{13}C -NMR Assignments of Berberine and Sanguinarine. *Heretocycles* 27 (1988) 911-916
- BLUME, A.J., SHORR, J., FINBERG, J.P.M., SPECTOR, S.: Binding of the Endogenous Nonpeptide Morphine-Like Compound to Opiate Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4927-4931
- BRADBURY, A.F., SMYTH, D.G., SNELL, C.R., BRIDSALL, N.J.M., HULME, E.C.: C-Fragment of Lipotropin has High Affinity for Brain Opiate Receptors. *Nature* 260 (1976) 793-795
- BRAESTRUP, C., SQUIRES, R.F.: Specific Benzodiazepine Receptors in Rat Brain Characterized by High Affinity [^3H]-Diazepam Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977), 3805-3809
- BRAESTRUP, C., NIELSEN, M., HONORE, T., JENSEN, L.H., PETERSEN, E.N.: Benzodiazepine Receptor Ligands with Positive and Negative Efficacy. *Neuropharmacology* 22 (1983) 1451-1457
- BREULING, M., ALFERMANN, W., REINHARD, E.: Cultivation of Cell Cultures of *Berberis wilsonae* in 20l Airlift Bioreactor Plant Cell Report 4 (1985) 220
- BROWN, J.T., CHARLWOOD, B.V.: Differentiation and Monoterpene Biosynthesis in Plant Cell Cultures. In: *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. Morris, P., Scragg, A.H., Stafford, A., Fowler, M.W. (eds.). Cambridge University Press (1986) 68-74

- BROWN, S., RENAUDIN, J.P., PRÉVOT, C., GUERN, J.: Flow Cytometry and Sorting of Plant Protoplasts - Technical Problems and Physiological Results from a study of pH and Alkaloids in Catharanthus roseus. Physiol. Vég. 22 (1984) 541
- BUFFUM, J.: Pharmacosexology: The Effects of Drugs on Sexual Funktion. J. of Psychoactive Drugs 14 (1982) 5-44
- BUTTAR, H.S.: Effects of the Combined Administration of Ethanol and Chlordiazepoxid on the Pre- and Postnatal Development of Rats. Neurobehavioral Toxicology 2 (1980) 217-225
- CAOLO, M.A., STERMITZ, F.R.: Benzophenanthridinium Salt Equilibria. Heterocycles 12 (1979) 11-15
- CHARDIN de, P.T.: L'Energie Humaine. In: Teilhard de Chardin, Auswahl aus dem Werk. Häfliger, L., Bader, J., Schmitz-Moormann, K. (eds.). Walter, Olten /Freiburg im Breisgau (1964) 98-143
- CHATTERJEE, S.K.: Cultivation of Medicinal Plants in India.: Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. Alfermann, A.W., Reinhard, E. (eds.). Ges. Strahlen- und Umweltforschung, München, FRG (1978) 203-213
- CHAVKIN, C., JAMES, I.F., GOLDSTEIN, A.: Dynorphin is a Specific Endogenous Ligand of the kappa Opioid Receptor. Science 215 (1982) 413-415
- CHENG, Y.C., PRUSOFF, W.H.: Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor which Causes 50 Percent Inhibition (IC_{50}) of an enzymatic Reaction. Biochem. Pharm. 22 (1973) 3099
- COHEN, H.G., SEIFEN, E.A., STRAUB, K.D., TIEFENBACH, C., STERMITZ, F.R.: Structural Specificity of Sodium Potassium ATPase Inhibition by Sanguinarine and Isoquinoline Benzophenanthridine Alkaloids. Biochem. Pharmacol. 27 (1978) 2555-2558
- COLLIER, E., WATKINSON, A., CLELAND, C.F., ROTH, J.: Partial Purifikation and Charakterisation of an Insulin-Like Material from Spinach and Lemna gibba G3. Journal of Biological Chemistry 262 (13), (1987) 6238-6243
- CONSTABEL, F., KURZ, W.W., TAM, W.H.J.: Verfahren zur Herstellung von Codein aus Pflanzenzellkulturen. Offenlegungsschrift 300740 Deutsches Patentamt (1980)
- CORDELL, G.A.: Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach. J. Wiley & Sons Inc. (1981) 515-516

- COSTA, E., FERRARI, M., FERRERO, P., GUIDOTTI, A.: Multiple Signals in GABAergic Transmission: Pharmacological Consequences. *Neuropharmacology* 23 (1984) 989-991
- COX, B.M., GOLDSTEIN, A., CHOH, H.L.: Opioid Activity of a Peptide, beta-Lipotropin (61-91), derived from beta-Lipotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1821-1823
- CURTIN, M.E.: Harvesting Profitable Products from Plant Tissue Culture. *Biotechnology* 1 (1983) 649-657
- CZAPEK, F.: *Biochemie der Pflanzen*. 2. Aufl. Vol. III. G. Fischer, Jena (1921)
- DBIR, S.K., SHEKAWTZ, N.S., PUROBIT, S.D., ARYA, H.C.: Development of Lacifer Cells in Callus Cultures of Calotropis procera. *R.B. Plant Cell Report* 3 (1984) 206
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H.: Exploitation of Plant Cells for the Production of Natural Compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 1965-1974
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H.: Instability of Indole Alkaloid Production in Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures. *Planta Med.* 50 (1984) 427-443
- DEWICK, P.M., MARTIN, M.: Biosynthesis of Pterocarpan, Isoflavan and Coumestan Metabolites of Medicago sativa: Chalcone, Isoflavone and Isoflavanone Precursors. *Phytochemistry* 18 (1979) 597-602
- DEWICK, P.M., BARZ, W., GRISEBACH, H.: Biosynthesis of Coumestrol in Phaseolus aureus. *Phytochemistry* 9 (1970) 775-783
- DICOSMO, F., MISAWA, M.: Eliciting Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. *Trends Biotechnol.* 3 (1985) 318
- DIXON, R.A.: Plant Tissue Culture Methods in the Study of Phytoalexin Induction. In: *Tissue Culture Methods in Plant Pathologists*. Ingram, D.S., Helgeson, J.P. (eds.). Oxford Blackswell's (1980) 185
- DIXON, R.A., BENDALL, D.S.: Changes in Phenolic Compounds Associated with Phaseolin production in Cell Suspension Cultures of Phaseolus vulgaris. *Physiol. Plant Pathol.* 13 (1978) 283-294
- DOLE, V.P., CUARTECASAS, P., GOLDSTEIN, A.: Biochemical Identification of Receptors: Criteria for Receptors. In: *Opiate Receptor Mechanism*. Snyder, S.H., Matthysse, S. (eds.). *Neurosc. Res. Prog. Bull.* 13 (1974) 24-26

- DONNERER, J., OKA, K., BROSSI, A., RICE, K.C., SPECTOR, S.: Presence and Formation of Codeine and Morphine in the Rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 4566-4567
- EHRlich, P.: Chemotherapeutics: Scientific principles, Methods and Results. Lancet 2 (1913) 445-451
- EIDEN, F.: Irrtümer bei der Suche nach neuen Arzneimitteln. In: Suche nach neuen Arzneistoffen. Zeschlik, D., Bombach, G., Eiden F. (eds.). Springer Verlag Berlin (1987) 91-115
- FARNSWORTH, N.R., MORRIS, R.W.: Higher Plants - a sleeping giant of drug development. Am. J. Pharm. 148 (1976) 46-52
- FARNSWORTH, N.R.: The Role of Medicinal Plants in Drug Development. In: Natural Products and Drug Development. Krogsgaard-Larsen, P., Brogger Christensen, S., Kofod, H. (eds.) Munksgaard, Copenhagen (1984) 17-22
- FETT, W.F.: Accumulation of Isoflavonoids and Isoflavone Glucosides after Inoculation of Soybean Leaves with Xanthomonas campestris pv. glycines and pv. campestris and a Study of their Role in Resistance. Physiol. Plant Pathol. 24 (1984) 303-320
- FETT, W.F., OSMAN, S.F.: Inhibition of Bacteria by Soybean Isoflavonoids Glyceollin and Coumestrol. Phytopathology 72 (1982) 755-760
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 3. Aufl. B.I. Wissenschaftsverlag. Mannheim Wien Zürich (1980) 9
- FOWLER, M.W.: In: Plant Biotechnology. Mantell, S.H., Smith, H. (eds.). Cambridge Univertity Press, London (1983) 3
- FOWLER, M.W., SCRAGG, A.H.: Natural Products from Higher Plant Cell Culture. In: Plant Cell Biotechnologie. Pais M.S.S., Mavituna, F., Novais, J.M. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg (1988) 165-177
- FROHNE, D., JENSEN, U.: Systematik des Pflanzenreichs. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1985) 119
- FUJITA, Y: Industriel Production of Shikonin and Berberine. In: Ciba Foundation Symposium 137. Applications of Plant Cell Tissue Culture. John Wiley & Sons Chichester New York Brisbane Toronto Singapore (1988) 228-238

- FUJITA, Y., HARA, Y., OGINO, T., SUGA, C.: Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of Lithospermum erythrorhizon. I. effect of Nitrogene Sources on the Production of Shikonin Derivatives. Plant Cell Report 1 (1981a) 59-60
- FUJITA, Y., HARA, Y., SUGU, C., MORIMOTO, T.: Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of Lithospermum erythrorhizon. II. A New Medium for the Production of Shikonin Derivatives. Plant Cell Report 1 (1981b) 61-63
- FUJITA, Y., TAKAHASHI, S., YAMADA, Y.: Selection of Cell Lines with high Productivity of Shikonin Derivatives by Protoplast Culture of Lithospermum erythrorhizon. Agric. Biol. Chem. 49 (1985) 1755-1759
- FUKUI, H., NAKAGAWA, K., TSUDA, S., TABATA, M.: In: Plant Cell Culture. Fujiwara, A. (ed.). Maruzen Press, Tokyo (1982) 313
- FULLER, K.W., BARLETT, D.J.: The Chemosynthetic Potential of Plants and its Realisation by Immobilized Systems. Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur. 26 (1985) 229-247
- FURUJA, T., IKUTA, A., SYONO, K.: Alkaloids from Callus Tissue of Papaver somniferum. Phytochemistry 11 (1972) 3041-3044
- GAMBORG, O.L., MÜLLER, P.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Sojabeen Root Cells. Exp. Cell. Res. 50 (1968) 151-158
- GARDNER, C.R., DEACON, R., JAMES, V., PARKER, F., BUDHRAM, P.: Agonist and Antagonist Activities at Benzodiazepine Receptors of a Novel Series of Quinoline Derivatives. Eur. J. Pharmacol. 142 (1987) 285-295
- GESSNER, O., ORZECOWSKI, G.: Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, C. Winter-Verlag Heidelberg (1974)
- GEUNS, J.M.C.: Steroid Hormones and Plant Growth and Development. Phytochemistry 17 (1978) 1
- GILBERT, P.E., MARTIN, W.R.: The effect of Morphine and Nalorphine-like Drugs in the Non-Dependent, Morphine-Dependent and Cyclazocine-Dependent Chronic Spinal Dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 198 (1976) 66-82
- GINTZLER, A.R., LEVY, A., SPECTOR, S.: Antibodies as a Mean of Isolating and Characterizing Biologically Active Substances: Presence of a Non-Peptide, Morphine-Like Compound in Central Nervous System. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2132-2136

- GINTZLER, A.R., GERSHON, M.D., SPECTOR, S.: A Nonpeptide Morphine-Like Compound: Immunocytochemical Localization in the Mouse Brain. *Science* 199 (1978) 447-448
- GNANAMANICKAN, S.S.: Isolation of Isoflavonoid Phytoalexins from Seeds of Phaseolus vulgaris L.. *Experientia* 35 (1979) 323
- GNANAMANICKAN, S.S., PATIL, S.S.: Phaseotoxin Suppresses Bacterially Induced Hypersensitive Reaction and Phytoalexin Synthesis in Bean Cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* 10 (1977a) 169-79
- GNANAMANICKAN, S.S., PATIL, S.S.: Accumulation of Antibacterial in Hypersensitively Responding Bean Leaf Tissues Inoculated with Pseudomonas phaseolicola. *Physiol. Plant Pathol.* 10 (1977b) 159-168
- GNANAMANICKAN, S.S., PATIL, S.S.: Role of Phytotoxin and Phytoalexins in Bean in Pseudomonas phaseolicola Interaction. *Curr. Trends Life Sci.* 6 (1979) 115-43
- GOLDSTEIN, A.: In: Biological and Behavioral Approaches to Drug Dependence. Cappell, H., LeBlanc, A.E. (eds.). Proceedings International Symposium on Alcohol and Drug Research, October 1973 (Addiction Research Foundation, Toronto) (1975) 27-41
- GOLDSTEIN, A., FISCHLI, W., LOWNEY, L.I., HUNKAPILLER, M., HOOD, L.: Porcine Pituitary Dynorphin: Complete Amino Acid Sequences of the Biologically Active Heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7219-7223
- GOLDSTEIN, A., BARRETT, R.W., JAMES, I.F., LOWNEY, L.I., WEITZ, C.J., KNIPMEYER, L.L., RAPOPORT, H.: Morphine and other Opiates from Beef Brain and Adrenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 5203-5207
- GRAVE, R., LUCKNER, M., VOGEL, E., TEWES, A., NOVER, L.: Growth Morphogenesis and Cardenolide Formation in Long Term Cultures of Digitalis lanata. *Planta Med.* 40 (1980) 92-103
- GREEN, R., SHIELDS, D., SHABER, M., KRAMER, R.: Secretion of Somatostatin from Yeast Intracellular Sorting and Processing of an Alpha Factor-Somatostatin Hybrid. Twenty-Fifth Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Atlanta, GA., USA. Nov. 18-22 (1985) *J. Cell Biol.* 101 (5 Part 2) (1985) 138A
- GREGSON, R.P., MARWOOD, J.F., QUINN, R.J.: The Occurrence of Prostaglandins PGE₂ and PGF₂ in a Plant - The Red Alga Gracilaria lichnoides. *Tetrahedron Lett.* 46 (1979) 4505-4506

- GRILL, E., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H.: Phytochelatins, a Class of Heavy-Metal-Binding Peptides from Plants, are Functionally Analogous to Metallothioneins. 84, 1987, 439-433
- GRIMMETT, M.R., RICHARDS, E.L.: Separation of Imidazoles by Cellulose Thin-Layer Chromatography J. Chromatog. 20 (1965)171
- GRISEBACH, H., BARZ, W.: Über die Biogenese des Coumestrols in der Luzerne (Medicago sativa L.) Z. Naturforsch. 18b (1963) 466
- GRUBER, K.A., WHITAKER, J.M., BUCKALEW JR., V.M.: Endogenous Digitalis-Like Substance in Plasma of Volume-Expended Dogs. Nature 287 (1980) 743-745
- GUGGOLZ, J., LIVINGSTON, A.L., BICKOFF, E.M., THOMPSON, C.R.: Determination of Coumestrol in Fresh and Dried Alfalfa. J. Agr. Food Chem. 9 (1961) 135-137
- GUIDOTTI, A., FORCHETTI, C.M., CORDA, M.G., KONKEL, D., BENNETT, C.D., COSTA, E.: Isolation, Characterization, and Purification to Homogeneity of an Endogenous Polypeptide with Agonist Action on Benzodiazepine Receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 3531-3535
- HAECKEL, E.: Natürliche Schöpfungsgeschichte. 3. Aufl. Georg Riener, Berlin (1872) 645
- HAEFELY, W.: Antagonists of Benzodiazepines: Functional Aspects. In: Benzodiazepine Recognition Site Ligands: Biochemistry and Pharmacolog. Biggio, G., Costa, E. (eds.). Raven Press New York (1983) 73-93
- HAGIMORI, M., MATSUMOTO, T., KISAKI, T.: Studies on the Production of Digitalis Cardenolides by Plant Tissue Culture. I. Determination of Digitoxin and Digoxin Contents in First and Second Passage Calli and Organ Redifferentiating Calli of Several Digitalis Species by Radioimmunoassay. Plant Cell Physiol. 21 (1980) 1391
- HAKIM, S.A.E., MIJOVIC, V., WALKER, J.: Distribution of Certain Poppy-Fumaria Alkaloids and a Possible Link with the Incidence of Glaucoma. Nature 189 (1961) 198-201
- HARBORNE, J.B.: In: Chemotaxonomy of Leguminosae. Harborne, J.B., Boulter, D., Turner, B.L. (eds.). Academic Press London (1971) 31-71
- HARBORNE, J.B.: Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press London (1982)

- HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H.: The Flavonoids. Chapman and Hall, London (1975)
- HAZEL, L.P.: Cultural Factors that Influence Secondary Metabolite Akkumulations in Plant Cell and Tissue Culture. Mantell, S.H., Smith, H. (eds.). Soc. Exp. Bot. Seminar Series 18 (1983) 75
- HAZUM, E., SABATKA, J.J., CHANG, K.-J., BRENT, D.A., FINDLAY, J.W.A., CUARTECASAS, P.: Morphine in Cow and Human Milk: Could Dietary Morphine Constitute a Ligand for Specific Morphine μ -Receptors? Science 213 (1981) 1010-1012
- HEJTMANKOVA, N., WALTEROVA, D., PREININGER, V., SIMANEK, V.: Antifungal Activity of Quaternary Benzo [c] phenanthridin Alkaloids from Chelidonium majus. Fitoterapia 55 (1984) 291-294
- HEMPEL, E., KLINGER, W.: Drug Stimulated Biotransformation of Hormonal Steroid Contraceptives. Clinical Implications. Drugs 12 (1976) 442-448
- HERRMANN, W.L.: Hormontherapie klimakterischer Beschwerden. In: Klimakterium der Frau. Schneider, H.P.G. (ed.). Kongress für Ärztliche Fortbildung Berlin (1982) 41-52
- HIROAKA, N., TABATA, N.: Alkaloid Production by Plant Regeneratet from Cultured Cells of Datura innoxia. Phytochem. 13 (1974) 1671-1675
- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Morphinan Alkaloids in Callus Cultures of Papaver somniferum. J.Nat.Prod. 45 (1982) 481-485
- HÜLLT, V.: Multiple Endogenous Opioid Peptides. Trends Neurosci. 6 (1983) 24-26
- HÜLTJE, H.-D.: Zum Verständnis der Molekularen Wirkungsmechanismen. Pharmazeutische Zeitung 127 (1982) 2808-2813
- HSU, A.F., BROWER, D., ETSKOVITZ, R.B., CHEN, P.K., BILLS, D.D.: Radioimmunoassay for Quantitative Determination of Morphine in Capsules of Papaver somniferum. Phytochemistry 22 (1983) 1665-1669
- HUGHES, J., SMITH, T.W., KOSTERLITZ, H.W., FOTHERGILL, L.A., MORGAN, B.A., MORRIS, H.R.: Identification of two Related Pentapeptides from the Brain with Potent Opiat Agonist Activity. Nature 258 (1975) 73-92

- HUSSLEIN, H.: Hormontherapie im Klimakterium. Wien. med. Wschr. 121 (1971) 211-216
- IKUTA, A., SYONO, K., FURUJA, T.: Alkaloids of Callus Tissue and Redifferentiated Platelets in the Papaveraceae. Phytochemistry 13 (1974) 2175-2179
- IKUTA, A., ITOKAWA, H.: Alkaloids of Tissue Cultures of Nandina domestica. Phytochemistry 27 (1988) 2813-2815
- INGHAM, J.L.: In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Zechmeister, L. (ed.). Springer-Verlag Wien 43 (1983) 1-266
- JACOB, K.H., AKTORIES, K., MINUTH, M. und SCHULTZ, G.: Inhibition of Adenylate Cyclase. Adv. in Cycl. Nucl. and Prot. Phosphor. Res. 19. Cooper, D.M.F., Seaman, K.B. (eds.). Raven Press, New York (1985) 137-150
- JATZKEWITZ, H.: Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln im Harn. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 292 (1953) 95-100
- JIZUKA, R., KAWAKAMI, S., TAKA, T., MATSUMOTO, S., INDE, S., MINOWA, H., ICHIKAWA, T., AOYANAGI, F.: Clinical Study of Cloxazolam on Gynecological Field. Cloxazolam-Benzodiazepin Derivative from Sankyo. World of Obstetrics and Gynecology 25 (1973) 673-680
- KADIKANI, H., FRUJUTANI, Y., TAKAHASHI, H., NODA, M., MORIMOTO, Y., HIROSE, T., ASAI, M., INAYAMA, S., NAKANISHI, S., NUMA, S.: Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Procine beta-neo-Endorphin/Dynorphin Precursor. Nature 298 (1982) 245-249
- KAUL, B., STABA, E.J.: Dioscorea Tissue Cultures. I. Biosynthesis and Isolation of Diosgenin from Dioscorea deltoidea Callus and Suspension Cells. Lloydia 31 (1968) 171-175
- KEEN, N.T., KENNEDY, B.W.: Hydroxyphaseollin and Related Isoflavonoids in the Hypersensitive Resistant Response of Soybeans against Pseudomonas glycinea. Physiol. Plant Pathol. 4 (1974) 173-186
- KEEN, N.T., TAYLOR, O.C.: Ozone Injury in Soybeans. Isoflavonoid Accumulation is Related to Necrosis. Plant Physiol. 55 (1975) 731-733

- KEEN, N.T., ZAKI, A.I., SIMS, J.J.: Biosynthesis of Hydroxyphaseollin and Related Isoflavonoids in Disease-Resistant Soybean Hypocotyls. *Phytochemistry* 11 (1972) 1031-1039
- KHANNA, P., KHANNA, R., SHARMA, M.: Production of Free Ascorbic Acid and the Effect of Exogenous Ascorbenic Acid and Tyrosine on the Production of Major Opium Alkaloids from an *in vitro* Tissue Culture of Papaver somniferum. Linn. Indian J. Exp. Biol. 16 (1978) 110-112
- KNOBLOCH, K.-H., BERLIN, J.: Influence of Medium Composition on the Formation of Secondary Compounds in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus (L.) G. Don. *Z. Naturforsch.* 35c (1980) 551
- KOCOUREK, J., BALLOU, C.E.: Method of Fingerprinting Yeast Cell Wall Mannans. *J. of Bacteriol.* 100 (1969) 1175-1181
- KOLOSSA, E.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Inhaltstoffen in Nicotiana Pflanzen und Zellkulturen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1983)
- KOSTERLITZ, H.W.: Biosynthesis of Morphine in the Animal Kingdom. *Nature* 330 (1987) 606
- KOUL, S., AHUJA, A., GREWAL, S.: Growth and Alkaloid Production in Suspension Cultures of Hyoscyamus muticus as influenced by Various Cultural Parameters. *Planta Med.* 47 (1983) 11
- KRANE, B.D., FAGBULE, M.O., SHAMMA, M., GÖZLER, B.: The Benzophenanthridine Alkaloids. *J. of Natural Products* 47 (1984) 1-43
- KRUSE, H., LOMMEL, A.: Untersuchungen über Cadmium bindende Proteine im Schaf-Champignon. *Lebensm. Unters. Forsch.* 168 (1979) 444-447
- KURZ, W.G.W., CONSTABEL, F.: Plant Cell Cultures, a Potentiell Source of Pharmaceuticals. *Adv. Appl. Microbiol.* 25 (1979) 209
- KUTCHAN, T.M., AYABE, S., COSCIA, C.J.: Cytodifferentiation and Papaver Alkaloid Akkumulation .In: The Chemistry and Biology of Isochinoline Alkaloids. Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin (1985) 281-294

- LANGLEY, J.N.: On the Physiology of the Salivary Secretion. Part II. On the Mutual Antagonism of Atropine and Pilocarpine, Having Especially Reference to their Relations in the Submaxillary Gland of the Cat. *J. Physiol.* **1** (1878) 339-369
- LAPPIN, G., TAMPION, J., STRIDE, J.: The Biotransformation of Monoterpenoids by Plant Tissue Culture. In: Secondary Metabolism in Plant Tissue Cultures. Morris, P., Scragg, A.H., Staffort, A., Fowler, M.W. (eds.). Cambridge University Press (1986) 113-116
- LAURITZEN, C.: Psychische Probleme in der Gynaekologie und Geburtshilfe. *Therapiewoche* **32** (1982) 1561-1562
- LEE, Y.J., NOTIDES, A.C., TSAY, Y.-G., KENDE, A.S.: Coumestrol, NBD-Norhexestrol, and Dansyl-Norhexestrol, Fluorescent Probes of Estrogen-Binding Proteins. *Biochemistry* **16** (1977) 2896-2901
- LENFELD, J., KROUTIL, M., MARSALEK, E., SLAVIK, J., PREININGER, V., SIMANEK, V.: Antiinflammatory Activity of Quaternary Benzophenanthridine Alkaloids from Chelidonium majus. *Planta Med.* **43** (1981) 161-165
- LEROITH, D., ROTH, J.: Vertebrate Hormones and Neuropeptides in Microbes Evolutionary Origin of Intercellular Communication. In: Frontiers in Neuroendocrinology. Martini, L., Ganong, W.F. (eds.). Raven Press. New York. Vol. 8 (1984) 1-26
- LEROITH, D., SHILOACH, J., ROTH, J.: Is there an Earlier Phylogenetic Precursor that is Common to both the Nervous and Endocrine System? 3RD Annual Winter Neuro-peptide Conference Breckenridge. Colo. USA. Jan. 20-23, 1982. *Peptides (NY)* **3** (3), (1982) 211-216
- LEROITH, D., PICKENS, W., WILSON, G.L., MILLER, B., BERELOWITZ, M., VINIK, A.I., COLLIER, E., CLELAND, C.F.: Somatostatin-Like Material is Present in Flowering Plants. *Endocrinology* **117** (5), (1985) 2093-2097
- LE-VAN, N.: Coumestrin, a Coumestan Derivative From Soybean Roots. *Phytochemistry* **23** (1984) 1204-1205
- LEYCK, S., ETSCHENBERG, E., HADDING, U., WINKELMANN, J.: A New Model of Acute Inflammation Cobra Venom Factor Induced Paw Edema. *J. Agents and Actions* **13** (1983) 437-438
- LINDSEY, K.: Manipulation by Nutrient Limitation of the Biosynthetic Activity of Immobilized Cells of Capsicum frutescens MILL. cv. annum. *Planta* **165** (1985) 126-133

- LINDSEY, K., YEOMAN, M.M.: The Relationship between Growth Rate, Differentiation and Alkaloid Accumulation in Cell Cultures. *J. Exp. Bot.* 34 (1983) 1055-1065
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 110-125
- LORD, J.A.H., WATERFIELD, A.A., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W.: Endogenous Opioid Peptides: Multiple Agonists and Receptors. *Nature* 267 (1977) 495-499
- LUCKNER, M.: Secondary Metabolism in Microorganism, Plants, and Animals. Springer Verlag, Berlin, 2nd Ed. (1984) 272-276
- LUCKNER, M., DIETRICH, B.: Die Regulation des Sekundärstoffwechsels. In: Biogene Arzneistoffe. Czygan, F.-C. (Herg.) Vieweg Braunschweig (1984) 45-59
- LYON, F.M., WOOD, R.K.S.: Production of Phaseollin, Coumestrol and Related Compounds in Bean Leaves Inoculated with Pseudomonas Species. *Physiol. Plant Pathol.* 6 (1975) 117-124
- MACHADO, A.: Poesia. Estudio, Notas y Comentarios de Texto. Por Maria Pilar Palomo. Narcea, S.A. (ed.). F. Rubio y Gali, Madrid (1974) 235
- MAJEWSKA, M.D., HARRISON, N.C., SCHWARTZ, R.D., BARKER, I.C., PAUL, S.M.: Steroid Hormone Metabolites are Barbiturate-Like Modulators of the GABA Receptor. *Science* 232 (1986) 1004-1007
- MANTELL, S.H., SMITH, H.: Cultural Factors that Influence Secondary Metabolite Accumulation in Plant Cell and Tissue Cultures. In: Plant Biotechnology. Mantell, S.H., Smith, H. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge (1983) 75-108
- MANTELL, S.H., PEARSON, D.W., HAZELL, L.P., SMITH, H.: The Effect of Initial Phosphate and Sucrose Levels on Nicotine Accumulation in Batch Suspension Cultures of Nicotiana tabacum L. *Plant Cell Report* 2 (1983) 73
- MARINO, A., GIOVANNI, V., CAGIANO, R., CARONE, A.R.: Farmacoterapia e Psicosomatica-Basi Scientifiche e Applicazioni Pratiche. Simposia della Societa Italiana di Neuropsico-Farmacologia. Anacapri/It. Giu 1-2 (1976) 113-128
- MARTIN, I.L.: The Benzodiazepines and their Receptors: 25 Years of Progress. *Neuropharmacology* 26 (1987) 957-970

- MARTIN, S.M.: Environmental Factors. B. Temperature, aeration and pH. In: Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. Staba, E.J. (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press (1980) 143
- MARTIN, W.R., EADES, C.G., THOMPSON, J.A., HULER, R.E., GILBERT, P.E.: The Effect of Morphine- and Nalorphine-like Drugs in the Nondependent and Morphine-dependent Choric Spinal Dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197 (1976) 517-532
- MÉRILLON, J.M., DOIREAU, P., GUILLOT, A., CHÉNIEUX, C.R. RIDEAU, M.: Indole Alkaloid Accumulation and Tryptophan Decarboxylase Activity in Catharanthus roseus Cell Cultured in three Different Media. Plant Cell Report 5 (1986) 23
- MERKUS, F.W.H.M., SMIT, E.H.D.: Chinin ein Evergreen in der Malariatherapie. Dtsch. Apotheker Zeitung 128 (1988) 785-788
- MITSCHER, L.A., PARK, Y.H., CLARK, D., CLARK, G.W., HAMMESFAHR, P.D., WU, W.-N., BEAL, J.L.: Antimicrobial Agents from Higher Plants. Ann Investigation on Hunne-mannia fumariæfolia Pseudocalkoholates of Sanguinarine and Chelerythrine. J. Nat. Prod. 41 (1978) 145-150
- MIURA, S.: Side Effects of Psychotropics on Menstruation. Japanese Medical Journal 2946 (1980) 177
- MÖHLER, H., OKADA, T.: Benzodiazepine Receptor: Demonstration in the Central Nervous System. Science 198 (1977) 849-851
- MORANDI, D., BAILEY, J.A., GIANINAZZI-PEARSON, V.: Isoflavonoid Accumulation in Soybean Roots Infected with Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Physiol. Plant Pathol. 24 (1984) 357-64
- MORIMOTO, T., HARA, Y., YOSHIOKA, T., FUJITA, Y., YAMADA, Y.: Production of Berberin by Suspension Cultures of Coptis japonica. In: Somers, D.A. (eds.) Abstr. 6th Int. Congr. Plant Tissue & Cell Culture, International Association of Plant Tissue Culture, Minneapolis (1986) 68
- MORRIS, P., SCRAGG, A.H., SMART, N.J., STAFFORT, A.: Secondary Product Formation by Cell Suspension Cultures. In: Plant Cell Culture: a Practical Approach. Dixon, R.A. (ed.). Oxford. IRL Press Ltd. (1985)
- MOTHES, K.: Secondary Substances -A Game of Nature? Wissenschaft und Fortschritt 30 (1980) 413-418

- MOTHES, K.: Zur Geschichte unserer Kenntnis über die Alkaloide. Pharmazie 36 (1981) 199-209
- MOTHES, K., SCHÜTTE, H.R., LUCKNER, M.: Biochemistry of Alkaloids. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach (1985)
- MÜLLER, A.B., AMMON, H.P.T.: Adenylatcyclase. Pharmazie in unserer Zeit. 2 (1986) 49-52
- MÜLLER, W.E.: Sind Benzodiazepine 100% Natur? Dtsch. Apotheker Zeitg. 13 (1988) 672-674
- MUNIER, R.: Nitrogenous Bases (Alkaloids, Amines, Vitamins) and Water-soluble Organic Acids Bull. soc. chim. France 19 (1952) 852-873
- NAHRSTEDT, A.: Strukturelle Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Sekundärstoffen. Medicinal Plant Research 44 (1982) 2-14
- NAKANISHI, S., INOUE, A., KITA, T., NAKAMURA, M., CHANG, A.C.Y., COHEN, S.N., NUMA, S.: Nucleotide Sequence of Cloned cDNA for Bovine Corticotropin-beta-Lipotropin Precursor. Nature 278 (1979) 423-427
- NELSON, K., PAVLIK, E.J., NAGELL, J.R., HANSON, M.B., DONALDSON, E.S., FLANIGAN, R.C.: Estrogenicity of Coumestrol in the Mouse: Fluorescence Detection of Interaction with Estrogen Receptors. Biochemistry 23 (1984) 2565-2572
- NETTLESHIP, L., SLAYTOR, M.: Adaption of Peganum harmala Callus to Alkaloid Production. J. Exp. Bot. 25 (1974) 1114
- NEUMANN, F.: Endokrinpharmakologie. Arzneimittelchemie und Pharmakodynamik. Schering AG Berlin. Persönliche Mitteilung (1988)
- NEWSOME, F.E., KITTS, W.D.: The Effects of Alfalfa Consumption on Estrogen Levels in Ewes. Can. J. Anim. Sci. 57 (1977) 531-535
- NEWSOME, F.E., KITTS, W.D.: The Effects of feeding Coumestrol on the Reproductive Organs of prepubertal lambs Can. J. Anim. Sci. 60 (1980) 53-58
- NIELSEN, M., FRØKJÆR, S., BRÆSTRUP, C.: High Affinity of the Naturally-occurring Biflavonoid, Amentoflavon, to Brain Benzodiazepine Receptors in vitro. Biochemical Pharmacology 37 (1988) 3285-3287

- NODA, M., FURUTANI, Y., TAKAHASHI, H., TOYOSATO, M., HIROSE, T., INAYAMA, S., NUMA, S.: Cloning a Sequence Analysis of cDNA for Bovine Adrenal Proenkephalin. *Nature* 295 (1982) 202-206
- NUTT, D.J.: Benzodiazepine Receptor Ligands. Neurotransmissions. Research Biochemicals Incorporated. 9 Erie Drive, Natick, Massachusetts 01760. *Neurochemicals for the Neuroscientist*. Vol. IV. 2 (1988) 1-6
- OKEBIYI, O.O., SOFOWORA, E.A.: Antimicrobial Alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (Fagara zanthoxyloides). *Planta Med.* 36 (1979) 204-207
- OKA, K., KANTROWITZ, J.D., SPECTOR, S.: Isolation of Morphine from Toad Skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1852-1854
- OKSMAN-CALDENTY, K.M., STRAUSS, A.: Somaclonal Variation of Scopolamine Content in Protoplast Derived Cell Culture Clones of Hyoscyamus muticus. *Planta Med.* (1986) 6-12
- OLAH, A.F., SHERWOOD, R.T.: Flavones, Isoflavones, and Coumestans in Alfalfa Infected by Ascochyta imperfecta. *Phytopathology* 61 (1971) 65-69
- OLESON, W.H.: Effect of Disease and Injury on Accumulation and Biosynthesis of Coumestrol in Alfalfa. From *Diss. Abstr. Int. B* 33 (1972) 1437
- O'NEILL, M.J.: Aureol and Phaseol, Two New Coumestans from Phaseolus aureus ROXB.. *Z. Naturforsch.* 38c (1983) 698-700
- O'NEILL, M.J., ADESANYA, S.A., ROBERTS, M.F.: Isosojagol, a Coumestan from Phaseolus coccineus. *Phytochemistry* 23 (1984) 2704-2705
- PARNHAM, M.J., BITTER, C.H., WINKELMANN, J.: Chemiluminescence from Mouse Resident Macrophages: Characterization and Modulation by Arachidonate Metabolites. *Immunopharmacology* 5 (1983) 277-291
- PARR, A.J.: Secondary Products from Plant Cell Culture. *Biotechnology in Agriculture* (1988) 1-34
- PASTEELS, J.M., DALOZE, D.: Cardiac Glycosides in the Defensive Secretion of Crysomelid Beetles: Evidence for their Production by the Insect. *Science* 197 (1977) 70

- PATEL, J., MARANGOS, P., GOODWIN, F.: [³H]Ethyl- β -Carboline-3-Carboxylate Binding to the Benzodiazepine Receptor is not Affected by GABA. Eur. J. Pharmac. 72 (1981) 419-422
- PAYNE, J., RHODES, M.J.C., ROBINS, R.J.: Quinoline Alkaloid Production by Transformed Cultures of Cinchona ledgeriana. Planta Med. 53 (1987) 367
- PERT, C.B., SNYDER, S.H.: Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. Science 179 (1973a) 1011-1014
- PERT, C.B., SNYDER, S.H.: Properties of Opiate-Receptor Binding in Rat Brain. Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (1973b) 2243-2247
- PETIARD, V., COURTOIS, D., GUERITTE, F., LANGLOIS, N., MOMPON, B.: New Alkaloids in Plant Tissue Cultures. Plant Tissue Cult., Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture (1982) 309-310
- PHILLIPS, R., HENSHAW, G.G.: The Regulation of Synthesis of Phenolics in Stationary Phase Cell Cultures of Acer pseudoplatanus L. J. Exp. Bot. 78 (1977) 785-794
- POLLACK, M.H., ROSENBAUM, J.F.: Management of Antidepressant-Induced Side-Effects: A Practical Guide for the Clinician. J. Clinical Psychiatry 48 (1987) 3-8
- PRADO de CARVALHO, L., VENAULT, P., POTIER, M.-C., DODD, R.H., BROWN, C.L., CHAPOUTHIER, G., ROSSIER, J.: 3-(Methoxycarbonyl)-Amino- β -Carboline, a selective Antagonist of the Sedative Effects of Benzodiazepines. Eurp. J. Pharmacol. 129 (1986) 323-332
- PSCHYREMBLE, W.: Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter. Berlin. New York (1982) 1032
- PURSHOTTAM, N., MARCUS, M.M., PINCUS, G.: Induced Ovulation in the Mouse and the Measurement of its Inhibition. Fertility and Sterility 12 (1961) 346-352
- REES, H.H.: In: Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry. Goodwin, T.W. (ed.). Academic Press London (1971) 181
- REID, R.L.: Premenstrual Syndrome: A Therapeutic Enigma. Drug Therapy 12, No.4. (1982) 65-75
- REINERT, J.: Morphogenesis and its Control on Tissue Cultures of Carrots. Naturwissenschaften 45 (1958) 344-345

- REPKE, H., LIEBMANN, C.: Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. Akademie Verlag Berlin (1987) 80-103
- RHODES, M.J.C., PAYNE, J., ROBINS, R.J.: Cell Suspension Cultures of Cinchona ledgeriana. II. The Effect of a Range of Auxins and Cytokinins on the Production of Quinoline Alkaloids. Planta Med. (1986a) 226
- RIZK, A.M., HAMMOUDA, F.M., ISMAIL, S.I., AZZAM, S.A., WOOD, G.: Studies on Green Beans (Phaseolus vulgaris L.). I. Phytoalexins of the Pods. Qual. Plant.- Plant Foods Hum. Nutr. 34 (1984) 203-209
- ROBBINS, M.P.: Co-Ordinated Induction of Enzymes of Secondary Metabolism. In: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. Morris, P., Scragg, A.H., Stafford, A., Fowler, M.W. (eds.). Cambridge University Press (1986) 108-112
- ROBINS, R.J.: The Measurement of Molecular Weight, Nonimmunogenic Compounds by Immunoassay. In: Modern Methods of Plant Analysis, New Series. Linskens, H.-F., Jackson, J.F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin 4 (1986) 86
- ROKEM, J.S., SCHWARZBERG, J., GOLDBERG, I.: Autoclaved Fungal Mycelia Increase Diosgenin Production in Cell Suspension Cultures of Dioscorea deltoidea. Plant Cell Report 3 (1984) 159
- ROSSITER, R.C., BECK, A.B.: Physiological and Ecological Studies on the Estrogenic Isoflavones in Subterranean Clover (Trifolium subterraneum). III. Effects of Light. Aust. J. Agr. Res. 18 (1967) 23-37
- ROTH, J.: Peptide Hormone Binding to Receptors: A View of Direct Studies in Vitro. Metabolism 22 (1973) 1059-1073
- ROUTIER, J.B., NICKELL, L.G.: US Patent 2, 747 (1956) 334
- RUBIN, B., PENNER, D., SAETTLER, A.W.: Induction of Isoflavonoid Production in Phaseolus vulgaris L. Leaves by Ozone, Sulfur Dioxide and Herbicide Stress. Environ. Toxicol. Chem. 2 (1983) 295-306
- RUSH, M.D., KUTCHAN, T.M., COSCIA, C.J.: Correlation of the Appearance of Morphinan Alkaloids and Laticifer Cells in germination Papaver bracteatum Seedlings. Plant Cell Reports 4 (1985) 237-240
- RUYTER, C.M., STÖCKIGT, J.: Neue Naturstoffe aus pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen. GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 33 (1989) 283-293

- SACHSE, J. : Die Bestimmung östrogenen Isoflavonoide und Cumöstrol in Klee (Trifolium partense L. und T. repens L.). J. of Chromatography 96 (1974) 123-136
- SAHAI, O., KNUTH, M.: Commercialising Plant Tissue Culture Processes: Economics, Problems and Prospects Biotechnology Progress 1 (1985) 1-9
- SANGAMESWARAN, L., BLAS de, A.L.: Demonstration of Benzodiazepin-Like Molecules in the Mammalian Brain with a Monoclonal Antibody to Benzodiazepines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 5560-5564
- SANGAMESWARAN, L., FALES, H.M., FRIEDRICH, P., BLAS de, A.L.: Purification of a Benzodiazepine from Bovine Brain and Detection of Benzodiazepin-Like Immunoreactivity in Human Brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 9236-9240
- SASSE, F., HECKENBERG, U., BERLIN, J.: Akkumulation of β -Carboline Alkaloids and Serotonin by Cell Cultures of Peganum harmala. I. Correlation between Plants and Cell Cultures and Influence of medium Constituents. Plant Physiol. 69 (1982) 400
- SCATCHARD, G.: The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660-674
- SCHIEL, O., JARCHOW-REDECKER, K., PIEHL, G.-W., LEHMANN, J., BERLIN, J.: Increased Formation of Cinnamoyl Putrescines by Fedbatch Fermentation of Cell Suspension Cultures of Nicotiana tabacum. Plant Cell Report 3 (1984) 18
- SCHILDKNECHT, H.: Chemische Ökologie -Ein Kapitel moderner Naturstoffchemie. Angew. Chemie 8 (1976) 235-243
- SCHLEE, D.: Ökologische Biochemie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1986)
- SCHNEIDER, H.P.G.: Klimakterium der Frau. Medizinische, psychologische und soziale Aspekte. Seminar anlässlich des Kongresses für ärztliche Fortbildung, Berlin (1982) 28-29
- SCHULTE, U., EL-SHAGI, H., ZENK, M.H.: Optimization of 19 Rubiaceae species in Cell Culture for the Production of Anthraquinones. Plant Cell Report 3 (1984) 51
- SCHULZ, R., WÜSTER, M., RUBINI, P., HERZ, A.: Funktional Opiate Receptors in the Guinea Pig Ileum: Their Differentiation by Means of Selective Tolerance Development. J. Pharmacol. Exp. Ther. 219 (1981) 547-550

- SCHUMACHER, H.-M., GUNDLACH, H., FIEDLER, F., ZENK, M.H.: Elicitation of Benzophenanthridine Alkaloid Synthesis in Eschscholtzia Cell Cultures. Plant Cell Report **6** (1987) 410-413
- SCHWEDT, G.: Chromatographische Trennmethoden. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979)
- SCHWERTHÖFER, R.: Vom Molekülroulette zum Drug-Design. In: Aus Wissenschaft und Forschung der Süddeutschen Zeitung vom 26. März 1987
- SCRAGG, A.H.: The Economics of Mass Cell Culture. In: Secondary metabolism in plant cell cultures. Morris, P., Scragg, A.H., Staffort, A., Fowler, M.W. (eds.). Cambridge University Press (1986) 202-207
- SCRAGG, A.H., MORRIS, P., ALLAN, E.J., BOND, P., SMART, N.J., FOWLER, M.W.: The effect of Scale-up on Plant Cell Culture performance. In: Process Possibilities for Plant and Animal Cell Culture. Webb, C., Mavituna, F. (eds.). I. Chem. E. Symposium, UIMST 1986. Chichester: Ellis Horwood Ltd. (1987) 78
- SEIFEN, E., STRAUB, K.D.: Effects of Sanguinarine on the Isolated Mammalian Heart. Pharmacologist **16** (1974) 245
- SEIFEN, E., ADAMS, R.J., RIEMER, R.K.: Sanguinarine: A Positive Inotropic Alkaloid which inhibits Cardiac Na^+/K^+ -ATPase. European Journal of Pharmacology **60** (1979) 373-377
- SHERWOOD, R.T., OLAH, A.F., OLESON, W.H., JONES, E.E.: Effect of Disease and Injury on Accumulation of a Flavonoid Estrogen, Coumestrol, in Alfalfa. Phytopathology **60** (1970) 684-688
- SHORR, J., FOLEY, K., SPECTOR, S.: Present of a Non-Peptide Morphine-Like Compound in Human Cerebrospinal Fluid. Life Sci. **23** (1978) 2057- 2062
- SHULER, M.L.: Produktion of Secondary Metabolites from Plant Tissue Culture - Problems and Prospects. Ann.NY Acad. Sci. **369** (1981) 65-80
- SIMANEK, V.: Benzophenanthridine Alkaloids. In: Alkaloids. Brossi, A. (ed.). Academic Press Inc., London **26** (1985) 185-240
- SIMON, E.J., HILLER, J.M., EDELMAN, I.: Stereospecific Binding of a Potent Narcotic Analgesic [^3H]-Etorphine to Rat Brain Homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70** (1973) 1947-1949

- SIMON, E.J., GROTH, J.: Kinetics of Opiate Receptor Inactivation by Sulfhydryl Reagents. Evidence for Conformational Change in Presence of Sodium Ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** (1975) 2404-2407
- SMART, N.L., FOWLER, M.W.: Effect of Aeration on Large-Scale Cultures of Plant Cells. *Biotechnol. Lett.* **3** (1981) 171
- SOUTHARD, G.L., BOULWARE, R.T., WALBORN, D.R., GROZNIK, W.J., THORNE, E.E., YANKELL, S.L.: Benzophenanthridine Alkaloids Containing Solutions for Treating Periodontal Diseases. *J. Am. Dent. Assoc.* **108** (1988) 338-341
- SQUIRES, R.F., BRÆSTRUP, C.: Benzodiazepine Receptors in Rat Brain. *Nature* **266** (1977) 732-734
- STERNBACH, L.H.: In: *The Benzodiazepines: From Molecular Biology to Clinical Practice*. Costa, E. (ed.). Raven New York (1983) 1-6
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K.: Growth and Organized Development of Cultured Cells II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *Am. J. Bot.* **45** (1958) 705-708
- STÖCKIGT, J., PAWELKA, K.-H., TANAHASHI, T., DANIELI, B., HULL, W.E.: Voafrine A and Voafrine B, New Dimeric Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Voacanga africana Stapf. *Helv. Chim. Acta* **66** (1983) 2525-2533
- STRAUB, K.D., CARVER, P.: Sanguinarine, Inhibitor of Na-K Dependent ATP'ase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **62** (1975) 913-922
- SUND, C.: Bestimmung von Papaver-Alkaloiden und Pflanzen-selektion mittels Radioimmunoassay. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1978)
- TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M.: Organisation and Alkaloid Production in Tissue Cultures of Scopolia parviflora. *Phytochemistry* **11** (1972) 949-953
- TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M.: Pigment Fromation in Callus Cultures of Lithospermum erythrorhizon. *Phytochemistry* **13** (1974) 927-937
- TABATA, M., OGINO, T., YOSHIOKA, K., YOSHIKAWA, N., HIRZOKA, N.: Selection of Cell Lines with Higher Yield of Secondary Products. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Thorpe, T.A. (ed.). University of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture (1978), 213

- TAM, W.H.J., CONSTABEL, F., KURZ, W.G.W.: Codeine from Cell Suspension Cultures of Papaver somniferum. Phytochemistry 18 (1980) 486-487
- TERENIUS, L.: Stereospecific Interaction between Narcotic Analgesics and a Synaptic Plasma Membrane Fraction of the Cerebral Cortex. Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenhagen) 32 (1973) 317-320
- TULECKE, W., NICKELL, L.G.: Production of Large Amounts of Plant Tissue by Submerged Culture Science 130 (1959) 863
- TURNBALL, A., GALPIN, I.J., SMITH, J.L., COLLIN, H.A.: Comparisson of the Onion Plant (Allium cepa) and Onion Tissue Culture. IV. Effect of Shoot and Root Morphogenesis on Flavour Precursor Synthesis in Onion Tissue Culture. New Phytologist 87 (1981) 257-268
- ULBRICH, B., WIESNER, W., ARENS, H.: Large Scale Production of Rosmarinic Acid from Plant Cell Cultures of Coleus blumei Benth. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Neumann, K.-H., Barz, W., Reinhard, E. (eds.). Springer, Berlin (1985) 293-303
- VICKERY, M.L., VICKERY, B.: Secondary Plant Metabolism. The Macmillan Press Ltd., London (1981)
- VIOLON, C., DEKEGEL, D., VERCRIJSSE, A.: Microscopical Study of Valepotriates in Liquid Droplets of Various Tissues from Valerian Plants. Plant Cell Reports 2 (1983) 300-303
- VIOLON, C., DEKEGEL, D., VERCRIJSSE, A.: Relation between Valepotriate Content and Differentiation Level in Various Tissues from Valerianae. J. Nat. Prod. 47 (1984) 934-940
- VOGT, M., POELDINGER, W.: Medikamentös induzierte Störungen der Sexualfunktion. Pharmakritik 4 (1982) 37-40
- VOLLOSOVITCH, A.G.: Some Peculiarities of Alkaloids Accumulation in Tissue Culture of Rauwolfia serpentina BENTH. In: Appendix: Late Submissions of Lecture Abstracts. 14th International Congress of Biochemistry. Vol.3 Videopress Prague July (1988)
- WAGNER, H., FESSLER, B.: In-Vitro-5-Lipoxygenase-Hemmung durch Eclipta alba Extrakte und das Coumestan-Derivat Wedelolacton. Planta medica 5 (1986), 374-377
- WAGNER, H., GEYER, B., KISO, Y., HIKINO, H., RAO, G.S.: Coumestans as the Main Active Principles of the Liver Drugs Eclipta alba und Wedelia calendulacea. Planta medica. 5 (1986) 370-374

- WAGNER, H., STUPPNER, H., PUHLMANN, J., BRÜMMER, B., DEPPE, K., ZENK, M.H.: Gewinnung von immunologisch aktiven Polysacchariden aus Echinacea-Drogen und -Gewebeulturen. Z. für Phytotherapie 10 (1989) 35-38
- WALLER, G.R., DERMER, O.C.: In: The Biochemistry of Plants. Conn, E.E. (ed.). Academic New York 7 (1981) 317-401
- WALTEROVA, D., ULRICOVA, J., PREININGER, V., LENFELD, J., LASOVSKY, J., SIMANEK, V.: Inhibition of Liver Alanine Aminotransferase Activity by some Benzophenanthridine Alkaloids. J. Med. Chem. 24 (1981), 1100 - 1003
- WASSERMAN, R.H., HENION, J.D., HAUSSLER, M.R., MCCAIN, T.A.: Calcinegenic Factor in Solanum malacoxylon: Evidence that it is 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Glycoside. Science 194 (1976) 853
- WEILER, E.W.: Radioimmuno-Screening Methods for Secondary Plant Products. In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin (1977) 266
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Digoxin and related Compounds in Digitalis lanata. Phytochemistry 15 (1976) 1537-1545
- WEILER, E.W., STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Scopolamine. Phytochemistry 20 (1981) 2009-2016
- WEINSTEIN, L.I., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions. XXIII. The Mechanism of the Antibacterial Action of Glycinol, a Pterocarpan Phytoalexin synthesized by Soybeans. Plant Physiol. 72 (1983) 557-563
- WEITZ, C.J., LOWNEY, L.I., FAULL, K.F., FEISTNER, G., GOLDSTEIN, A.: Morphine and Codeine from Mammalian Brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 9784-9788
- WEITZ, C.J., FAULL, K.F., GOLDSTEIN, A.: Synthesis of the Skeleton of Morphine Molecules by Mammalian Liver. Nature 330 (1987) 674-677
- WERNER, H., FRIDKIN, M., AVIV, D., KOCH, Y.: Immunoreactive and Bioactive Somatostatin-Like Material is Present in Tobacco Nicotiana tabacum. Peptides (Fayetteville) 6 (5), (1985) 797-802
- WESTEKEMPER, P., WIECZOREK, U., GUERITTE, N., LANGLOIS, N., LANGLOIS, Y., POTIER, P., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of the Indole Alkaloid Vindoline in Catharanthus. Planta medica 39 (1980) 24-37

- WHITEHEAD, I.M., DEY, P.M., DIXON, R.A.: Differential Patterns of Phytoalexin Accumulation and Enzyme Induction in wounded and Elicitor-Treated Tissues of Phaseolus vulgaris. Planta 154 (1982) 156-164
- WIERMANN, R.: Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 7. Conn, E. (ed.). Acad. Press New York London Toronto Sydney San Francisco (1981) 85-116
- WILDMANN, J.: Increase of Natural Benzodiazepines in Wheat and Potato during Germination. Biochemical and Biophysical Research Communications. 157 (3), (1988) 1436-1443
- WILDMANN, J., MÖHLER, H., VETTER, W., RANALDER, U., SCHMITT, K., MAURER, R.: Diazepam und N-Desmethyldiazepam are found in Rat Brain and Adrenal and may be of Plant Origin. J. Neural. Transm. 70 (1987) 383-398
- WILKINSON, M., MOGER, W.H. GROVESTINE, D.: Chronic Treatment with Valium (Diazepam) fails to affect the Reproductive System of the Male Rat. Life Science 27 (1980) 2285-2291
- WILLIAMS, M.: Molecular Aspects of Benzodiazepin and Nonbenzodiazepin Anxiolytics: A hypothetical Allosteric Model of the Benzodiazepine Receptor Complex. Prog. Neuropsychopharmacol. and Biol. Psychiat. 8 (1984) 209-247
- WILLIAMS, D.: The Menopause. Brit. med. J. 2 (1971) 208-210
- WITHERING, W.: An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheimer Morgen Verlag GmbH (1984) XIV
- WONG, E.: In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Zechmeister, L. (ed.), Springer-Verlag Wien 28 (1970) 1-63
- WONG, E.: The Isoflavonoids. In: The Flavonoids. Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (eds.). Chapman and Hall London (1975) 743
- WONG, E., LATCH, G.C.M.: Coumestans in Diseased White Clover. Phytochemistry 10 (1971) 446-448
- WÜSTER, M., SCHULZ, R., HERZ, A.: Multiple Opiate Receptors in Peripheral Tissue Preparations. Biochem. Pharmacol. 39 (1981) 1883-1887

- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.: Anthrachinon Production by Cell Suspension Cultures of Morinda citrifolia. Plant Med. Suppl. 79 (1975) 101-136
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of Indolalkaloids Serpentine und Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1977) 27-43
- ZILG, H., GRISEBACH, H.: Biosynthesis of Isoflavons -XVII. Identification and Biosynthesis of Coumestanes in Soia hispida. Phytochemistry 7 (1968) 1765-1772

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk für die Anregung des so interessanten wie unerschöpflichen Themas der vorliegenden Dissertation, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und erforderlicher Mittel zur Bearbeitung des Themas, für die Zeit, die er mir für die Betreuung als Doktorvater zur Verfügung gestellt hat.

Viele pflanzliche Naturstoffe wurden mir zu Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Meinen Dank für die Bereitstellung verschiedener Wedelolacton-Derivate, von Prunetin und Apigenin richte ich an Herrn Prof. Dr. H. Wagner (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München). Herr Prof. Dr. W. Barz (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) überließ mir zahlreiche Isoflavonoide; an dieser Stelle meinen herzlichen Dank. Frau Dr. M.J. O'Neill (Department of Pharmacocnosity, School of Pharmacy, University London) danke ich für die Zusendung einer Probe Lupinalbin A.

Herrn Dr.H. Schübel und Herrn Dipl. Biol. R. Stadler danke ich für die Aufnahme und Interpretation der Massen- und NMR-Spektren.

Es bleibt, all jenen Ungenannten zu danken, die in irgendeiner Form zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, besonders aber den Menschen, deren Gebet meinen Weg begleitet hat.

von Rosemarie Antonia Ruhoff

GEBURTSDATEN: 4. August 1956 in Köln als Tochter der Eheleute Gerhard A. Ruhoff und Maria P. Ruhoff, geb. Pionke

SCHULBILDUNG:

Besuch der Volksschule Köln-Rath
vom April 1963 bis Juli 1967

Besuch des staatlich anerkannten Mädchen-Gymnasiums in privater Trägerschaft Liebfrauen-Schule Köln- Lindenthal ab September 1967 bis zum Abitur am 22. Juni 1976

STUDIUM:

Ab September 1976 Aufnahme eines religions-pädagogischen Studiums an der Abteilung Schule/Hochschule des Erzbischöflichen Generalvikariats Köln

Überreichung der Missio Canonica unter Erzbischof Kardinal J. Höffner am 16. Juni 1979

Ab November 1977 Aufnahme des Diplom-Biologie Studiums an der Albertus Magnus Universität zu Köln mit der Fachrichtung Botanik , Biochemie sowie Pharmakologie;

Abschluß des Studiums mit der Diplom-Hauptprüfung für Studierende der Biologie am 21. Januar 1986

Ab Januar 1986 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk;
Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig - Maximilians - Universität München

*Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más.
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.*

Antonio Machado

Wanderer, es sind deine Spuren, der Weg und nichts weiter.
Wanderer, es gibt keinen Weg, Wege entstehen erst durch Gehen.

Durch Gehen entstehen Wege, und beim Zurückwenden des Blicks
trifft er den Pfad, der nimmermehr betreten wird.

Wanderer, es gibt keinen Weg, ohne Spuren auf dem Meer.

